

FACULTÉ DE PHARMACIE

Série E

N° 1

Année 1937-1938.

Contribution à l'Etude de l'Edestine
Son application au titrage de la pepsine

THÈSE

pour l'obtention du

Diplôme Supérieur de Pharmacien

présentée et soutenue le juin 1938,

PAR

Rodolphe CORTESI,

Pharmacien,

Licencié ès sciences naturelles.

JURY

MM. GORIS, *Président.*

MASCRÉ, *Professeur.*

JANOT, *Maître de Conférences.*

PARIS

LIBRAIRIE MALOINE

27, RUE DE L'ECOLE DE MÉDECINE (VI^e).

1938

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Série E

N° 1

Année 1937-1938.

Contribution à l'Etude de l'Edestine
Son application au titrage de la pepsine

THÈSE

pour l'obtention du

Diplôme Supérieur de Pharmacien

présentée et soutenue le juin 1938,

PAR

Rodolphe CORTESI,

Pharmacien,

Licencié ès sciences naturelles.

JURY

MM. GORIS, *Président.*

MASCRÉ, *Professeur.*

JANOT, *Maitre de Conférences.*

PARIS

LIBRAIRIE MALOINE

27, RUE DE L'ECOLE DE MÉDECINE (VI^e).

1938

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

Administration

MM. P. GUÉRIN, Doyen, O. ✱, 🌿 I.
P. LEBEAU, Assesseur, Membre de l'Institut, O. ✱, 🌿 I.
P. DESPORT, Secrétaire, ✱, 🌿 I.

Professeurs

MM. GUÉRIN, O. ✱, 🌿 I. Botanique générale.
LEBEAU, Membre de l'Institut,
O. ✱, 🌿 I. Pharmacie chimique.
GORIS, O. ✱, 🌿 I. Pharmacie galénique.
DAMIENS, ✱, 🌿 I. Chimie minérale.
HERISSEY, O. ✱, 🌿 I. Chimie biologique.
SOMMELET, ✱, 🌿 I. Chimie organique.
LUTZ, ✱, 🌿 I. Cryptogamie et Microbiologie.
FABRE, ✱, 🌿 I. Toxicologie.
LAUNOY, O. ✱, 🌿 I. Zoologie.
DELABY, ✱, 🌿 I. Chimie analytique.
PICON, 🌿 I. Physique.
MASCRE, 🌿 I. Histoire naturelle des médicaments
simples d'origine végétale.

Doyen honoraire : M. RADAIS, O. ✱, 🌿 I.

Professeurs honoraires :

MM. BEHAL, G. O. ✱, 🌿 I. et DELEPINE, O. ✱, 🌿 I,
membres de l'Institut.
GUERBET, ✱, 🌿 I., PERROT, C. ✱, 🌿 I., COUTIERE, O. ✱, 🌿 I.,
BOUGAULT, O. ✱, 🌿 I., TASSILLY, O. ✱, 🌿 I.

Maîtres de conférences

BACH, 🌿 I. Microbiologie.
FLEURY, 🌿 I. Hydrologie et Hygiène.
BEDEL, 🌿 I. Minéralogie et Législation et Déontologie
pharmaceutiques.
RÉGNIER, 🌿 I. Parasitologie.
CHARONNAT, 🌿 I. ... Chimie et Pharmacie chimique.
JANOT Pharmacie galénique et Biologie végétale.

Chefs des travaux pratiques

MM. DOMANGE, Travaux pratiques Chimie générale et pharmaceu-
de 1^{re} année tique.
GAUTIER, Travaux pratiques de
2^e et 3^e année Chimie analytique.
GUILLOT, Travaux pratiques de
4^e année Chimie biologique et Pharmacie
chimique.
PARIS Micrographie.
X Physique.
DEVAL, ✱, 🌿 I. Microbiologie.

Bibliothécaire en Chef : M. GARNIER, 🌿 A.



A MON MAÎTRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE

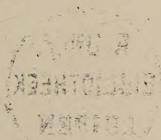
MONSIEUR LE PROFESSEUR GORIS

Membre de l'Académie de Médecine.

Officier de la Légion d'Honneur.

Directeur de la Pharmacie centrale des Hôpitaux.

Très respectueux hommage.



A MONSIEUR LE PROFESSEUR MASCRÉ

Professeur de Matière Médicale à la Faculté de Pharmacie.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR M. M. JANOT

Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie.

En témoignage de ma vive gratitude.

A MON FILS JACQUES

INTRODUCTION

Nous devons le sujet de cette thèse à Monsieur le Professeur GORIS.

Le Directeur de la Pharmacie Centrale des Hôpitaux de Paris déplorait depuis longtemps les difficultés rencontrées par ses laboratoires relativement à la vérification des pepsines livrées à l'Assistance publique, par suite de la défectuosité de l'essai du Codex.

D'autre part, le Professeur de Pharmacie galénique n'ignorait pas les profonds désaccords existant entre les diverses Pharmacopées sur le même sujet.

Enfin, sachant les essais tentés dans ce domaine par le moyen de l'édestine (Méthode de DELAUNAY et BAILLY¹; Méthode de FULD²; Procédé PLÉ³), il souhaitait, avant de nous conseiller d'utiliser à notre tour ce protéide, en posséder une connaissance plus approfondie.

La raison de ce travail a donc été triple : Essais de la pepsine dans les pharmacopées; Etude de l'édestine; Utilisation de cette dernière.

(1) DELAUNAY et BAILLY. — Sur une méthode d'essai rapide de la pepsine médicinale. *B. S. P.*, 1915, 22, 24 à 27.

(2) FULD et LEVISON. Die Pepsinbestimmung mittels der Edestinprobe. *Bioch. Ztschr.*, 1907, 6, 473.

(3) PLÉ. Contribution à l'étude de la purification de la pepsine. *Th. D. Ph.*, Paris, 1929.

Nous l'avons divisé en 3 parties et 7 chapitres :

1^{re} PARTIE : LA PEPSINE.

Chapitre I. — La pepsine; son activité protéolytique; son essai.

Chapitre II — Méthodes de dosage de la pepsine dans les diverses pharmacopées.

Chapitre III. — Critique de ces méthodes.

2^e PARTIE : L'ÉDESTINE.

Chapitre IV. — Origine; Caractères; Extraction; Propriétés générales.

Chapitre V. — Hydrolyse de l'édestine par la pepsine.

Chapitre VI. — Vitesse de clivage de l'édestine.

3^e PARTIE : APPLICATIONS.

Chapitre VII. — Titrage de la pepsine au moyen de l'édestine.

CONCLUSIONS.

BIBLIOGRAPHIE.

TABLE DES MATIÈRES.

Nous sommes très sensible au grand honneur que nous a fait Monsieur le Professeur GORIS en acceptant la présidence de cette thèse.

Nous n'oublierons pas l'intérêt qu'il n'a cessé de nous porter et nous lui gardons une très vive reconnaissance pour les conseils qu'il n'a pas manqué de nous prodiguer.

Nous remercions aussi Monsieur le Professeur MASCRÉ qui nous a réservé le meilleur accueil, nous a formulé d'utiles observations et a bien voulu faire partie de notre Jury.

Il nous est très agréable également de témoigner à Monsieur le Professeur JANOT notre très vive gratitude. Il a encouragé nos efforts, guidé nos recherches. Nous avons mis tant de fois son amabilité et sa science à contribution, que nous lui devons de sincères et chaleureux remerciements.

Nous remercions respectueusement M. le Professeur JAVILLIER, Membre de l'Institut, Professeur de Chimie biologique à la Sorbonne, pour l'aimable accueil qu'il a bien voulu nous réserver à diverses reprises.

Nous n'oublions pas en l'assurant de notre sincère amitié, M. le Professeur F. CHODAT, de l'Université de Genève qui, au cours de notre séjour à son Institut Général de Botanique, s'est parfois intéressé à nos recherches.

Comme il est devenu une tradition chez les aspirants au doctorat, nous avons eu recours à l'inépuisable compétence bibliographique du Dr WEITZ, Assistant au Laboratoire de Matière Médicale de la Faculté de Pharmacie. Nous lui en sommes profondément reconnaissant.

Nous n'oublierons pas enfin la Maison HOFFMANN-LAROCHE. Cette grande firme, dont la réputation mondiale fait tant honneur à la science pharmaceutique, nous a ouvert les portes de ses Laboratoires parisiens. Nous avons pu y préparer une assez grande quantité d'édestine et une partie de ce travail est le résultat de notre séjour chez elle. Nous en remercions particulièrement ses chefs : Monsieur MULLER, Directeur général et M. le Dr KARL, Directeur technique.

PREMIERE PARTIE

LA PEPSINE

CHAPITRE I

SON ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE; SON ESSAI

Il ne semble pas contre-indiqué, au seuil de ce travail consacré à un protéide : l'*édestine*, de réserver quelques pages au plus important des ferments protéolytiques : la *pepsine*.

Identifiée par RÉAUMUR et SPALLANZANI comme le principe actif du suc gastrique, baptisée par SCHWANN en 1836 et isolée par WASMAN, en 1839, la pepsine est une protéase, c'est-à-dire un ferment capable d'hydrolyser certaines matières protéiques, en milieu acide.

On l'obtient facilement par macération aqueuse d'une caillette de veau ou d'une muqueuse stomacale de porc, en milieu acide, et évaporation dans le vide, à consistance pâteuse.

L'industrie utilise couramment le procédé suivant :

100 kgs de muqueuses lavées et brossées, sont broyés et mis à macérer dans 150 litres d'eau, additionnés de 1 kilo. d'acide chlorhydrique ou de 800 gr. d'acide sulfurique.

On fait ensuite digérer pendant 6 heures, à 45°, en agitant fréquemment.

Après repos et décantation, on filtre et on évapore dans le vide. La pâte obtenue est desséchée dans le vide et donne une masse très friable et très hygroscopique qui est une *pepsine* pouvant « titrer » (nous verrons plus loin la signification de ce terme) 450 et même 500.

Le résidu de la digestion, contenant encore de la pepsine, est mis à digérer de nouveau pendant 6 heures dans l'eau acidulée. Après filtration, le liquide concentré et desséché donne une pepsine titrant 150 à 200.

Il suffit de broyer et de mélanger intimement les deux pepsines ainsi obtenues pour avoir finalement un produit titrant 300 ou 350, que l'on ajuste ensuite aux exigences du Codex.

Le rendement est de 12 à 13 kgs de *Pepsine* titre 100 pour 100 kgs de Muqueuses. (Codex 1908).

ASPECT. — La pepsine est généralement une poudre blanchâtre ou jaune pâle, d'odeur particulière, non putride; de saveur faiblement douceâtre ou salée, non amère.

On la rencontre aussi en *pâte* et en *paillettes*.

Les trois variétés sont officinales et représentent les pepsines, dites *extractives*.

On utilise souvent aussi un mélange de pepsine et d'amidon (pepsine amylacée); ou de pepsine et de sucre de lait (pepsine lactosée). Ces deux formes sont également officinales¹.

A côté de quelques albumoses ou peptones qu'elles renferment, comme d'ailleurs les pepsines extrac-

(1) Elles sont inscrites au Codex 1937.

tives, elles ont le défaut de contenir souvent des microorganismes de toute nature : levures, moisissures, etc.

CONSTITUTION.

On admet que la pepsine contient divers éléments : Carbone, Hydrogène, Oxygène, Azote, Soufre, Phosphore, Fer et Chlore. Pour NORTHROP¹ il est difficile de l'étudier au point de vue chimique : il est probable qu'elle se composerait d'une fraction inactive et d'une kinase, ou coferment.

Pour sa *calcination*, les exigences sont variables suivant les pays² : la Pharmacopée Helvétique admet 3,5 % de cendres au maximum; l'Allemagne 1 %. L'Italie ne tolère qu'une très petite quantité de résidu (*tenuissima*). La France, l'Angleterre et les Etats-Unis ne donnent aucune indication.

La pepsine est *hygroscopique* : la Pharmacopée suisse tolère une teneur en humidité de 5 % au maximum. Le Codex 1937 recommande seulement de la conserver en flacon bien bouchés, à l'abri de l'air et de la lumière.

PURIFICATION. — La pepsine, nous venons de le voir, est souvent accompagnée de matières protéiques.

On peut la purifier par divers procédés.

FENGER et ANDREW³ l'obtiennent pure, par préci-

(1) NORTHROP. Chemical natur of Pepsin. *Chemic Abstr.* par *Journ. amer. pharm. Assoc.*, 1929, p. 240, 18, N° 3 et *Apoth. Zeit.*, 1929, N° 52, p. 791.

(2) C'est déjà un 1^{er} désaccord.

(3) FENGER et ANDREW. On the isoelectric precipitation of Pepsin. *Journ. of biol. Chem.*, 1927, 73, N° 2, p. 371.

pitation isoélectrique, au moyen de l'acétone à 75 %. La pepsine est alors totalement insoluble dans l'eau distillée; mais complètement soluble dans l'eau acidulée. La zone isoélectrique est entre pH 2,4 et 3,85.

FORBES¹ la précipite au moyen de la safranine et reprend ensuite ce colorant par l'alcool isoamylique. Le produit obtenu est très actif : il donne par hydrolyse des traces de purine et divers acides aminés. Le point isoélectrique est alors pH 2,5.

Enfin, NORTHROP² a publié une méthode permettant d'obtenir une pepsine *cristallisée*, très active, à partir de la pepsine commerciale.

Et, en collaboration avec HERRIOTT³, le même auteur a obtenu des dérivés acétylés cristallisés de la pepsine, par action du cétène sur une solution aqueuse du ferment (pH compris entre 4,0 et 5,5).

PROPRIETES. — Facilement soluble dans l'eau et la glycérine, la pepsine est presque insoluble dans l'alcool, l'éther et le chloroforme. Elle est assez altérable; pas ou très peu dialysable, visible à l'ultramicroscope⁴ et susceptible d'adsorption et de floculation⁵.

Complexe de nature protidique et par conséquent colloïdal, cet enzyme a le pouvoir de s'attaquer à la molécule protéique. Il la dégrade progressivement,

(1) J. C. FORBES. The Purification of Pepsin, its properties and Physical Characters. *Journ. of biol. Chem.*, 1927, 71, N° 3, p. 559-585.

(2) JOHN NORTHROP. Crystalline Pepsin. Isolation and test of purity. *Journ. of gen. Physiol.*, 1930, 13, p. 739; d'après *Bull. Soc. Chim.*, 1931, 50, p. 1342.

(3) HERRIOTT et NORTHROP. Crystalline acetyl derivatives of Pepsin. *Journ. of gener. Physiol.*, 1934, 18, 36, 67.

(4) PLÉ. *Loc. cit.*

(5) Propriétés communes à tous les colloïdes.

en milieu acide et à une température optimum, qui est de 50° environ : au delà, la vitesse de la réaction diminue, le ferment approchant de la température à laquelle il est détruit (68°).

Les protéides sont ainsi transformés en peptones, probablement par suite de l'ouverture de certaines liaisons, on ne sait trop lesquelles¹, et, en tous cas, pas les liaisons du type $R-CO-NH-R'$, d'après STEUDEL, ELLINGHAUS et GOTTSCHALK².

Par contre, l'activité de la pepsine ne se modifie pas, même en élevant la température à 100°, si l'enzyme est à l'état sec.

Ce pouvoir protéolytique s'atténue en présence d'une quantité d'alcool dépassant 20 %. Il est entravé par certains produits inorganiques : une solution de bicarbonate de sodium, de potassium ou d'ammonium ajoutée à froid; les solutions diluées d'alcalis caustiques; les mélanges contenant du bismuth, de la morphine, etc. Dans ce dernier cas, l'action digestive est plus ou moins annihilée par l'alcalinité du milieu³.

Toutefois l'addition de benzoate de soude n'altère pas le pouvoir protéolytique. (Benzoate ajouté pour faciliter les injections)⁴.

Les matières colorantes suivantes : auramine, violet de méthyle, rouge de Bordeaux, vert malachite, bleu de méthylène, bleu d'aniline, éosine, méthyl-

(1) COLIN, *Les Diastases*, Paris, O. Doin, 1931.

(2) STEUDEL, ELLINGHAUS et GOTTSCHALK. Versuche zur Charakterisierung der Pepsinwirkung. *Zeit. f. phys. Chem.* CLIV, 1926, p. 21 et p. 198.

(3) J. F. TOCHER, *Pharm. Journ.*, London, 1906, N° 1873, p. 571.

(4) BORSALINO-SEMERIA. Wirkung von Natriumbenzoat auf Pepsininjektionslösungen. *Biochim. Terap. Sperim.*, 1933, 20, 533 à 561.

range et phloxime entravent considérablement la digestion pepsique¹.

De même, parmi les médicaments : l'acide salicylique et ses dérivés, même à doses faibles; l'antipyrine, le pyramidon.

Par contre, quelques alcaloïdes, du groupe de la quinoléine et de l'isoquinoléine; les hydrates de carbone (sucre de canne et gomme arabique); et les médicaments spécifiquement gastriques (quinquina, citron, cannelle, valériane) n'ont aucune influence retardatrice².

Contrairement aux autres protéases, la pepsine n'agit bien qu'à un pH élevé (1,5 à 2) : concentration ionique qui correspond à un milieu contenant environ 2,5 à 3 p. 1.000 d'acide chlorhydrique, ce dernier, qui est l'acide normal du suc gastrique, étant l'acide de choix pour effectuer une hydrolyse rapide.

Le pH de conservation optimum des solutions est de 3,6 à 4,6; et les solutions glycinées se conservent mieux que les solutions aqueuses.

Enfin, la pepsine possède une bande d'absorption dans l'ultra-violet, entre 2.600 et 2.900 Angströms. Par refroidissement à — 100°, cette bande se résout en plusieurs bandes fines, pouvant être en relation avec son activité³.

(1) M. S. SATO. Über den Einfluss von Anilinfarbstoffen auf Diastase und Pepsin. *Journ. of Jap. pharm. Soc.*, 1907, d'après *Pharm. Zeit.*, 1907, p. 1022.

(2) HEIDUSCHKA et FORSTER. Beiträge zur Kenntnis des Pepsins. *Arch. Ph.* 1932, 270, p. 419.

(3) G. I. LAVIN, J. H. NORTHROP et H. S. TAYLOR. The Low Temperature absorption spectrum of Pepsin. *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1933, 55, p. 3497.

PROTEOLYSE. — Ce phénomène a été longuement et diversement étudié par les auteurs. Sans nous y appesantir, notons que les protéïdes les plus facilement clivés par la pepsine sont, par ordre de vitesse décroissante : *Edestine*, Alkali-Albumine, Acide-Albumine, Fibrine, Ovalbumine, Nucléoprotéïdes¹. Les parois stomacales sont normalement abritées de l'action fermentaire, par la mucine qui les protège. (A cette théorie assez discutée, on oppose parfois l'hypothèse d'antiferments protecteurs).

Pratiquement, *on ne trouve pas d'acides aminés* en fin d'opération : l'hydrolyse pepsique s'arrête en effet beaucoup plus tôt que la digestion trypsique. On a pu noter cependant la présence de faibles quantités de trypsine dans les pepsines commerciales². Elles ont pour origine le sang, dont il est impossible de débarrasser complètement les muqueuses stomacales. Elles n'ont aucune influence sur la digestion pepsique.

La pepsine présente une autre propriété, au moins curieuse. Comme la présure, elle est capable de coaguler le lait. Ce phénomène se produisant à un pH de 6, on est en droit de se demander si on doit la considérer comme un enzyme à double effet, suivant la réaction du milieu ou si nous sommes en présence d'un mélange intime de deux enzymes difficilement séparables.

(1) BERG. Cité par H. COLIN. Les diastases, Paris, O. Doin, 1930.

(2) BOURQUELOT et HÉRISSEY. Sur la présence de faibles quantités de trypsine dans les pepsines commerciales. *J. Ph. Ch.*, 1903, 17, p. 164 à 169.

DEFINITION DU TERME « TITRE ». — Dans le langage pharmaceutique courant, on a coutumé de déterminer l'activité d'une pepsine, par l'usage du mot « *Titre* » suivi d'un nombre. Nous avons utilisé ce terme à propos de la fabrication industrielle du ferment, page 14.

Le titre d'une pepsine est, en somme, le rapport qui existe entre le poids du ferment et le poids d'un protéide : selon le Codex français, « il est donné par le poids, exprimé en grammes, de fibrine de porc, essorée, hydrolysée par 1 gramme de pepsine, c'est-à-dire qu'une pepsine de titre 100 digère 100 fois son poids de *fibrine essorée*, dans des conditions déterminées » ¹.

Il est regrettable de constater que cette explication française n'a pas la même valeur à l'étranger. Une pepsine belge (1906) de titre 100 ne peptonise pas 100 fois son poids de protéide, mais 140 fois au sens français du mot, d'après les essais de P. LEGRAND². Le même auteur a montré qu'une pepsine anglaise de titre 2.500 correspond à une pepsine au titre français de 170; et qu'une pepsine américaine au titre de 3.000 équivaut à une pepsine au titre français de 300.

On aperçoit, dès maintenant, les multiples confusions ou erreurs provoquées par ce désaccord. On a

(1) PLÉ. *Loc. cit.*

(2) P. LEGRAND. Contribution à l'étude des essais pharmaceutiques de la pepsine. *Th. D. Ph., Paris*, 1929. Les titres français ont été établis en faisant des essais à la *fibrine*, suivant la méthode du Codex 1908, en employant les pepsines étrangères; alors que les titres indiqués par chaque pays ont été fixés par des essais à l'*ovalbumine*, suivant une technique particulière à chaque pharmacopée.

parlé au Congrès international de Pharmacie de Copenhague de 1937 de l'unification des monographies dans les différentes Pharmacopées ¹. Ne pourrait-on précisément, dans le cas présent, proposer l'adoption d'une pepsine standard internationale, de titre uniforme : 200 ou 300 par exemple ? ? Une semblable décision éviterait, une fois pour toutes, bien des ennuis.

Non seulement, les pharmacopées ne sont pas d'accord sur le « Titre » de leurs pepsines respectives; mais pour la détermination même de ce titre, elles emploient des *méthodes différentes*. Sans parler, dès maintenant, des divergences de détail qui seront étudiées plus longuement au Chapitre II, il convient de préciser que, pour mesurer l'activité du ferment, le *protéide* change souvent d'un pays à l'autre. Dans une question aussi délicate que celle de l'action enzymatique, ne semble-t-il pas indispensable de commencer par se placer *partout* dans des conditions absolument identiques de titrage et, en tout premier lieu, d'utiliser *le même protéide*. Les protéides sont les substances les plus compliquées qui soient : comment, dans leur transformation moléculaire effectuée par la pepsine, peut-on prétendre obtenir des résultats comparables quand l'un des deux principaux facteurs de l'opération n'est pas le même d'une nation à sa voisine ? ?

Ces deux regrettables constatations étant établies, l'objet de ce travail sera, non pas de remédier à la

(1) LORMAND, Congrès international de Pharmacie. Copenhague, 1937.

première (proposition d'une pepsine standard internationale), mais d'essayer l'introduction, dans le titrage de la pepsine, d'un protéide : l'*édestine*, qui, à de multiples points de vue, semble présenter beaucoup d'avantages.

Mais, avant d'aborder ce problème, disons quelques mots de l'essai de la pepsine du Codex français (Supplément de 1920 et 1937). Nous en ferons la description, accompagnée de quelques commentaires. Le Chapitre II en montrera les différences ou les analogies avec les principales pharmacopées du monde.

ESSAI FRANÇAIS DE LA PEPSINE

Il consiste uniquement à en mesurer le « Titre », puisque les méthodes habituelles de dosage des médicaments sont ici impraticables, en raison même de la nature de l'enzyme et de sa complexité.

Le protéide utilisé en France est la *Fibrine sèche*, et par un réactif, l'acide nitrique, on vérifie au bout de 6 heures, le degré de l'hydrolyse. C'est là, en somme, un dosage ou un titrage biologique. A notre époque, où de semblables titrages sont courants, il est curieux de constater que l'essai de la pepsine, utilisé depuis trente ans, reflétait, avec quelques années d'avance, la tendance actuelle de la pharmacie contemporaine.

Procédé du Codex 1908 :

— La pepsine doit répondre à l'essai suivant :

Pepsine	0.10
Eau distillée	58.50
Acide chlorhydrique dilué 1/10	1,50
Fibrine desséchée (R)	2.50

Dans un flacon à large ouverture, introduisez la fibrine, l'eau distillée et l'acide chlorhydrique dilué; placez ensuite ce flacon dans une étuve ou un bain-marie chauffé à + 50°, jusqu'à ce que le mélange ait atteint la même température, ajoutez alors la pepsine et faites digérer pendant six heures en ayant soin, au début, d'agiter fréquemment jusqu'à dissolution complète de la fibrine, et ensuite toutes les heures environ.

Laissez refroidir et filtrez.

10 centimètres cubes de la liqueur ainsi obtenue ne doivent pas, à la température ordinaire, se troubler par l'addition de vingt gouttes d'acide azotique officinal.

Dans cet essai, on peut remplacer la fibrine desséchée par 10 grammes de fibrine essorée (R); il faut alors réduire à 51 grammes la proportion d'eau distillée¹.

Commentaires.

Fibrine. On peut l'employer sous deux formes : fraîche ou sèche. Cette question sera étudiée en détail page 30.

(1) Les 7 gr. 50 d'eau distillée en moins, sont en fait remplacés dans l'essai par 7 gr. 50 d'eau contenus dans les 10 grs de fibrine essorée.

pH. L'hydrolyse décrite par le Codex s'effectue à un pH de 1,8, c'est-à-dire dans des conditions excellentes.

Température. La température de 50° exigée, est difficile à réaliser par un praticien ne possédant pas une étuve bien réglée.

Elle est pratiquement impossible à maintenir au bain-marie, pendant 6 heures, à moins d'être occupé toute l'après-midi uniquement à sa surveillance.

Durée de l'essai. Pour cette raison, et pour d'autres que nous étudierons au chapitre II, la durée de 6 heures demandée par le Codex est trop considérable.

Touche azotique. Elle est indispensable pour la vérification de la disparition totale de la fibrine après sa dislocation moléculaire par le ferment : l'acide nitrique présentant sur d'autres réactifs possibles, l'avantage de ne pas précipiter les peptones.

Procédé du Codex 1937 :

Essai protéolytique.

Dissolvez dans un ballon jaugé de 100 cc., 1 gr. de pepsine dans un peu d'eau bidistillée et complétez à 100 cc. Introduisez dans un flacon de 125 cc. muni d'un bouchon de verre :

Solution de pepsine à 1 %	5 cc.
H Cl N/	4 cc. 3
Fibrine de porc desséchée étalon	2 gr. 5
Eau bidistillée	60 cc.

Mélangez par agitation et placez le flacon dans un thermostat à eau chauffé à 50°, de façon que le li-

quide du thermostat dépasse de 2 cm. le niveau du liquide dans le flacon.

Faites digérer pendant 6 heures, en ayant soin, au début, d'agiter fréquemment jusqu'à la dissolution complète de la fibrine et ensuite toutes les heures.

Déterminez le pH du liquide en fin d'opération, en utilisant le méthylorange : le pH devra être de 3,4. Refroidissez alors rapidement le liquide et filtrez immédiatement à plusieurs reprises, si cela est nécessaire, pour obtenir une solution limpide. Si, à 10 cm³ du filtrat, à la température de 17-19°, vous ajoutez goutte à goutte 1 cm³ d'acide azotique, le liquide devra rester limpide. Dans ces conditions, la pepsine protéolyse 50 fois son poids de fibrine *sèche*, ce qui correspond à 200 fois son poids de fibrine *essorée fraîche*, ce qu'on exprime, en disant que la pepsine possède le titre de 200 (titre protéolytique).

Fibrine de porc desséchée étalon.

Prenez de la fibrine de porc fraîche et lavez-la avec soin à l'eau, sur un tamis, jusqu'à ce qu'elle soit parfaitement blanche.

Placez-la dans un nouet et essorez rapidement à la main par petites quantités. Divisez au hachoir. Jetez la pulpe obtenue dans 2 fois son poids d'alcool à 95°. Laissez en contact 2 heures : agitez à plusieurs reprises. Faites égoutter sur un linge et exprimez fortement dans un nouet ou mieux à la presse. Divisez à nouveau la masse au hachoir, puis séchez-la rapidement dans le vide ou dans une étuve chauffée à 40°.

Broyez, passez au tamis module N° 26.

Effectuez le dosage de l'humidité par séchage à 100°.

La détermination de l'activité protéolytique au moyen de la fibrine doit être pratiquée sur de la fibrine dont on connaît la teneur en fibrine desséchée à 100°.

Conserver en flacons paraffinés.

Le Laboratoire National de contrôle des médicaments délivre la fibrine desséchée étalon.

Commentaires :

Sans vouloir critiquer dès maintenant une méthode qu'il convient de ne juger qu'à l'épreuve du temps et de la pratique, on peut cependant constater :

1) Que toutes les remarques relatives à la fibrine (page 45) restent justifiées et que le Codex 1937 n'y apporte aucune solution.

2) Que désormais la préparation de la fibrine est plus difficile pour le pharmacien.

3) Que l'essai protéolytique lui-même est devenu presque impossible dans une officine moyenne.

Enregistrons par contre que le pouvoir protéolytique de la pepsine officinal est augmenté : le ferment est 2 fois plus actif au Codex 1937 qu'au Codex 1908.

CHAPITRE II.

TITRAGES DE LA PEPSINE DANS DIVERSES PHARMACOPEES

Etudions les *méthodes de dosage* de la pepsine, utilisées dans vingt Nations.

Nous en ferons la *critique* dans le Chapitre suivant.

Ces méthodes ont été recueillies dans les dernières éditions ou les derniers suppléments des différentes pharmacopées nationales.

Nous les énumérerons d'abord en détail pour éviter de répéter à chaque moment le N° de l'édition des volumes et leur date de parution.

ALLEMAGNE	6 ^e Edition	Année 1926.
ANGLETERRE	4 ^e Edition	Année 1932.
AUTRICHE	8 ^e Edition	Année 1906.
BELGIQUE	4 ^e Edition	Année 1930.
DANEMARK	8 ^e Edition	Année 1933.
ESPAGNE	8 ^e Edition	Année 1930.
ETATS-UNIS	11 ^e Edition	Année 1936.
FRANCE	5 ^e Edition	Année 1908.
	6 ^e Edition	Année 1937.
GRÈCE	4 ^e Edition	Année 1924.
HOLLANDE	6 ^e Edition	Année 1926.
HONGRIE	4 ^e Edition	Année 1934.
ITALIE	5 ^e Edition	Année 1929.
JAPON	4 ^e Edition	Année 1922.

NORVÈGE	4 ^e Edition	Année 1934.
PORTUGAL	5 ^e Edition	Année 1936.
ROUMANIE	4 ^e Edition	Année 1926.
SUÈDE	10 ^e Edition	Année 1925.
SUISSE	5 ^e Edition	Année 1934.
U. R. S. S.	8 ^e Edition	Année 1934.
YUGOSLAVIE	3 ^e Edition	Année 1934.

*Comparaison des différents éléments de titrage
de la pepsine suivant les pharmacopées
énumérées ci-dessus.*

I) *PROTEIDE.*

Pour titrer 0,10 de Pepsine, titre 100 français.

La France utilise 2 gr. 5 de *Fibrine sèche* ou 10 gr. de
Fibrine fraîche.

L'Allemagne utilise 10 gr. d'*Ovalbumine* coagulée pen-
dant 10 minutes.

L'Angleterre utiliserait 43 gr. 10 d'*Ovalbumine* coagu-
lée pendant 15 minutes¹.

L'Autriche utilise 10 gr. d'*Ovalbumine* modérément
(*subtiliter*) coagulée.

La Belgique utilise 10 gr. d'*Ovalbumine* cuite, tamisée
et pressée entre 2 feuilles de papier-filtre pour
enlever l'excès d'eau.

Le Danemark ne parle pas de la pepsine dans sa
pharmacopée.

L'Espagne utilise 10 gr. d'*Ovalbumine.*

(1) L'Angleterre et les Etats-Unis emploient en réalité des
chiffres différents. Mais leurs pepsines titrant respectivement 2,500
(titre 170 français); 3.000 (titre 300 français), nous avons ramené
les proportions de leurs essais à celles d'une pepsine française
titre 100.

Les Etats-Unis utiliseraient 100 gr. d'*Ovalbumine* cuite pendant 15 minutes ¹.

La Grèce ne parle pas de la pepsine dans sa pharmacopée.

La Hollande utilise 15 gr. d'*Ovalbumine* cuite pendant 5 minutes : et tamisée à travers le tamis B 20.

La Hongrie utilise 10 gr. d'*Ovalbumine* cuite pendant 10 minutes et passée au tamis N° IV.

L'Italie utilise 10 gr. d'*Ovalbumine* récemment coagulée.

Le Japon utilise 10 gr. d'*Ovalbumine* coagulée pendant 8 minutes.

La Norvège utilise 10 gr. d'*Ovalbumine* cuite pendant 10 minutes.

Le Portugal utilise 10 gr. d'*Ovalbumine* cuite pendant 15 minutes et passée au tamis N° IV.

La Roumanie utilise 10 gr. d'*Ovalbumine* cuite pendant 5 minutes et passée au tamis N° IV.

La Suède utilise 10 gr. d'*Ovalbumine* cuite pendant 10 minutes.

La Suisse utilise 8 gr. 33 de *Caséine*.

L'U. R. S. S. utilise 10 gr. d'*Ovalbumine* cuite pendant 10 minutes et passée à travers un tamis métallique.

La Yougoslavie utilise 10 gr. d'*Ovalbumine* cuite pendant 10 minutes et passée au tamis N° IV.

En résumé :

1 pays (France) utilise la Fibrine ¹.

1 pays (Suisse) utilise la Caséine.

Tous les autres utilisent l'*Ovalbumine* ².

(1) Voir note (1) de la page précédente.

(2) On peut conclure de ce tableau combien les pepsines étrangères doivent être en général peu actives, si l'on songe que 0 gr. 10 de pepsine anglaise titre 2.500 = titre 170 français est capable de digérer 43 gr. 10 d'ovalbumine; tandis que les autres pepto-

L'emploi de ces trois protéides mérite quelques commentaires :

Leur préparation.

Fibrine. On la retire du sang de porc (Codex) de préférence au sang de veau, de mouton ou de cheval. On doit rejeter le sang de bœuf, dont les filaments, plus compacts et plus volumineux, sont difficilement attaquables.

On bat le sang avec un petit balai d'osier ou mieux de fer galvanisé, pour éviter le passage dans le sang de petits éclats de bois. Les filaments de fibrine s'attachent aux brindilles du balai : on les lave à grande eau; on les exprime et on les essore dans un linge. On a ainsi la Fibrine *fraîche*.

Il suffit de dessécher ce produit à l'étuve pour qu'il perde son eau et donne la fibrine *sèche* ¹.

Caséine. On additionne le lait frais de 2 gr. 90 d'acide acétique par litre. Le précipité est lavé et mis en suspension dans l'eau. On le dissout dans le carbonate d'ammonium en léger excès. On filtre.

On additionne le filtrat d'acide acétique. Le précipité formé est lavé et repris 4 fois par le Carbonate d'Ammonium.

On lave à l'eau pure et on sèche (Technique de BÉCHAMP) ².

Ovalbumine. On choisit un œuf frais; on en sépare

nisent 10 gr. seulement. A ce taux, elles correspondent presque toutes à un titre français de 30 à 40 : ces calculs étant faits d'après la thèse de LEGRAND (loc. cit.) et ses conclusions.

(1) Le Codex 1937 donne les détails d'une technique spéciale que nous avons décrite page 25.

(2) Pierre THOMAS. Manuel de Biochimie, Paris, Masson, 1936.

le jaune et on fait cuire le blanc légèrement, jusqu'à coagulation.

On peut aussi cuire l'œuf entier au bain-marie, détacher la coquille et séparer le blanc et le jaune, respectivement.

Leur aspect.

Fibrine. Poudre blanche, d'odeur et de saveur nulles, insoluble dans l'eau, se gonflant dans les acides et alcalis dilués où elle finit par former un sol.

Son point iso-électrique est $\text{pH} = 6,0$.

Caséine. Poudre blanche également, d'odeur nulle, de saveur légèrement salée, insoluble dans l'eau; soluble dans les alcalis et les carbonates alcalins, ainsi que dans l'eau de chaux. Elle est assez hygroscopique.

Son point iso-électrique est $\text{pH} = 4,5-4,7$.

Ovalbumine. Masse blanche, plus ou moins molle, connue de tous. Un œuf normal en contient environ 25 à 35 gr.¹.

II) SOLUTION ACIDULEE.

Pour titrer 0,10 de Pepsine, titre 100 français.

La France	prescrit	69 cc.	3	de solution acidulée.
L'Allemagne	—	100 cc.	5	
L'Angleterre	—	100 cc.		
L'Autriche	—	100 cc.		
La Belgique	—	90 cc.		

(1) Le blanc d'œuf dont elle provient est un liquide légèrement verdâtre, très épais : sa densité est 1,045 et son pH : 8,24. Il était utilisé au Codex 1908 pour la préparation du Soluté de Peptonate de Mercure.

L'Espagne	—	102 cc. 5.
Les Etats-Unis	—	50 cc.
La Hollande		150 cc.
La Hongrie	—	95 cc.
L'Italie	—	105 cc.
Le Japon	—	100 cc.
La Norvège	—	100 cc.
Le Portugal	—	100 cc.
La Roumanie	—	100 cc.
La Suède	—	100 cc.
La Suisse	—	10 cc. (dosage spécial ¹⁾)
L'U. R. S. S.	—	100 cc.
La Yougo-Slavie	—	100 cc.

Ainsi, le volume de la Solution acidulée varie, en général, entre 60 cc. et 150 cc. Entre ces 2 chiffres extrêmes (France et Etats-Unis) on peut dire que partout, on adopte la quantité de 100 cc.; exception faite pour la Suisse, dont le microdosage mérite une place à part; la proportion de solution acidulée ramenée aux quantités normales utilisées partout ailleurs serait dans ce pays de 1.000 cc.

III) ACIDE.

L'acide de choix pour assurer une protéolyse convenable est, *dans tous les pays*, l'acide chlorhydrique. Il mordance la fibrine vis-à-vis de la pepsine (et proba-

(1) Note de l'auteur.

blement aussi la caséine et l'ovalbumine¹⁾, comme la kinase intestinale la mordance vis-à-vis de la trypsine².

L'unanimité ne se reproduit pas sur la quantité à employer.

La France indique 1 gr. 50 d'acide chlorhydrique dilué.

L'Allemagne indique 0 cc. 5 d'acide chlorhydrique pur.

L'Angleterre indique 50 cc. d'une solution chlorhydrique à 6,5 d'HCl pour 1.000.

L'Autriche indique 1 à 6 cc. d'acide chlorhydrique dilué.

La Belgique indique 3 gr. 50 d'acide chlorhydrique dilué.

L'Espagne indique 2 gr. 50 d'acide chlorhydrique dilué.

Les Etats-Unis indiquent 150 cc. d'une solution acide obtenue avec 35 cc. HCl/N et 385 cc. Eau.

La Hollande indique 0,14 d'acide chlorhydrique pur.

La Hongrie indique 2 cc. d'acide chlorhydrique dilué.

L'Italie indique 5 cc. d'acide chlorhydrique dilué.

Le Japon indique 0 cc. 5 d'acide chlorhydrique pur.

La Norvège indique 3 cc. d'acide chlorhydrique dilué.

Le Portugal indique 0 cc. 40 d'acide chlorhydrique pur.

La Roumanie indique 2 grs d'acide chlorhydrique dilué.

La Suède indique 3 cc. d'acide chlorhydrique 2 N.

La Suisse indique 0 cc. 26 d'acide chlorhydrique N/.

L'U. R. S. S. indique 1 gr. d'acide chlorhydrique dilué.

(1) Note de l'auteur.

(2) P. CARNOT et A. CHASSEVANT. Des conditions de fixation de la pepsine sur les albuminoïdes. *C. R. Soc. Biol.*, 1901, 53, p. 1172-1174. (On considère aujourd'hui qu'il agit plutôt comme un proferment).

La Yougo-Slavie indique 10 gttes d'acide chlorhydrique pur.

On voit que l'on utilise indifféremment l'acide chlorhydrique pur, l'acide chlorhydrique dilué, l'acide chlorhydrique N et 2N.

Les deux premiers (acide pur et dilué) n'ayant pas tous les pays, il ne semble pas inutile de les com-la même densité ni la même teneur en gaz HCl, dans parer :

Il convient en effet de distinguer les 3 formes suivantes d'acide chlorhydrique : *gazeux*, *pur* ou *officinal* et *dilué*.

L'acide chlorhydrique *gazeux* n'intervient pas dans les essais de pepsine.

L'acide chlorhydrique *pur* ou *officinal* est une solution aqueuse du précédent, renfermant pour 100 grs : 35,5 à 36 grs d'HCl gazeux (Codex français) : ce pourcentage variant avec les pharmacopées, suivant le tableau ci-dessus.

Enfin l'acide chlorhydrique *dilué* est une dilution de l'acide chlorhydrique officinal, suivant des proportions indiquées par le tableau de la page 36, 1^{re} colonne.

*L'acide chlorhydrique officinal dans les
différentes pharmacopées.*

PAYS	Densité	HCl pur : % de solu- tion offici- nale	1 litre à 15° contient en HCl gaz :	Poids molé- culaire.
ALLEMAGNE	1,122 à 1,123	24,8 à 25,2	272 gr.	36,47
ANGLETERRE . . .	1,158 à 1,168	32 (a)	373 (b)	36,46
AUTRICHE	1,124	25	280	—
BELGIQUE	1,186	35,6	420	36,47
DANEMARK	0	0	0	0
ESPAGNE	1,171	36,5	418 à 443	36,47
ETATS-UNIS . . .	1,155	32 (a)	372 (b)	—
FRANCE	1,171	36,5	418 à 443	—
GRÈCE	1,125	25	280	—
HOLLANDE	1,127	25	282	—
HONGRIE	1,123 à 1,124	25	280	—
ITALIE	1,18	35,39	418	36,46
JAPON	1,152	30	371	—
NORVÈGE	1,126 à 1,128	25	280	—
PORTUGAL	1,19	37	434	—
ROUMANIE	1,126 à 1,127	25	280	36,5
SUÈDE	1,15 à 1,17	30 à 34	346 à 399	36,47
SUISSE	1,1266 à 1,1276	24,9 à 25,1	280,25 à 282,76	36,47
U. R. S. S.	1,126	25	280	—
YUGO-SLAVIE . .	1,126 à 1,127	24,8 à 25,2	280 à 282	—

a) Au moins 31 %; au plus 33 %.

b) A 15°5.

La teneur en HCl pur varie entre 24,8 et 37 %.

Les pays où l'acide chlorhydrique officinal est le plus riche sont : le Portugal, la France et l'Espagne. Ceux où il est le plus faible sont la Norvège, la Roumanie, l'U.R.S.S., etc.

*L'acide chlorhydrique
dilué dans les différentes pharmacopées.*

Pays	Préparation (a) HCl off. Eau		Densité à 15°	Pourcentage en HCl pur en poids (%)
ALLEMAGNE	100	100	1,059 à 1,061	12,4 à 12,6
ANGLETERRE	100	219	1,045 à 1,052 (b)	10
AUTRICHE	100	100	1,060	12,5
BELGIQUE	100	400	1,037	8,04
DANEMARK	—	—	—	—
ESPAGNE	100	234	1,049	10
ETATS-UNIS	100	219	1,049 (c)	Pas moins de 9,5 et pas plus de 10,5.
FRANCE	100	234	1,049	10
GRÈCE	100	100	1,061	12,5
HOLLANDE	100	72	1,068 à 1,069	13,1
HONGRIE	100	150	1,045	10
ITALIE	100	400	1,039	8,07
JAPON	—	—	—	—
NORVÈGE	100	150	1,045	10
PORTUGAL	—	—	—	—
ROUMANIE	100	150	1,049	10,49
SUÈDE	100	300	1,035	7
SUISSE	100	150	1,0495 à 1,0505	9,9 à 10,1
U. R. S. S.	100	200	1,04	8,3
YUGO-SLAVIE	100	100	1,061 à 1,063	12,4 à 12,6

a) Pour plus de commodité, nous avons ramené les quantités à 100 d'HCl pur : Ex. la France, 297 p. 703, soit 100 p. 234; l'Angleterre : 313 p. 687, soit 100 p. 219.

b) A 15°.

c) A 25°.

Le plus fort HCl dilué est donc en Hollande et le plus faible en Suède : le pourcentage en HCl pur variant entre 7 et 13,1 : différences qui, dans le titrage de la pep-sine, se traduisent par un écart de pH minime.

De ces 2 tableaux, on peut tirer les observations suivantes :

Alors qu'en France, on opère avec un acide à 1,049, les autres pays emploient un acide à 1,06, 1,05, 1,04, 1,03, etc., ce qui correspond à un pourcentage de 13,1 à 7, en HCl pur.

Malgré que celui-ci soit plus ou moins concentré lui-même suivant les pays (voir tableau page 35), la quantité d'HCl dilué utilisée dans le titrage est si réduite (1 à 5 cc. pour 100 à 150 cc. d'eau) que le pH final ne s'en trouve pas influencé et est sensiblement le même partout. Nous l'avons mesuré pour la France : 1,8; l'Allemagne : 2,0; l'Angleterre : 2,2; la Belgique : 2,2; l'Espagne : 1,8; les Etats-Unis : 2,0; l'Italie : 1,6; la Suisse : 2,4.

En définitive, partout, le milieu chlorhydrique se rapproche ou est identique au milieu optimum exigé pour une bonne digestion pepsique.

IV) TEMPERATURE DE DIGESTION

En France	on prescrit	50°
En Allemagne	—	45°
En Angleterre	—	40-41°
En Autriche	—	40°
En Belgique	—	50°
En Espagne	—	40°
Aux Etats-Unis	—	52°
En Hollande	—	45°

En Hongrie	—	40°
En Italie	—	38-40°
Au Japon	—	50°
En Norvège	—	45°
Au Portugal	—	40-45°
En Roumanie	—	40-45°
En Suède	—	40-45°
En Suisse	—	40°
En U. R. S. S.	—	40-47°
En Yougo-Slavie	—	45°

La température de digestion oscille donc, suivant les pharmacopées, entre les chiffres extrêmes de 38° et de 52° : celui de 45° semblant être le plus courant.

Les Pharmacopées de la France, de la Belgique et du Japon sont donc les seules à spécifier la température optimum de digestion pepsique. Les Etats-Unis la dépassent et les autres pays se contentent de l'approcher plus ou moins.

V) DUREE DE LA PROTEOLYSE

Le Codex français	recommande :	6 heures.
La Pharmacopée allemande	—	: 3 heures.
— anglaise	—	: 6 heures. (Agiter toutes les 15 minutes).
— autrichienne	—	: 4 heures. (Agiter toutes les 5 minutes).
— belge	—	: 2 heures.
— espagnole	—	: 6 heures. (En 1 heure ou 2, la majeure partie de l'albumine est dissoute).

La Pharmacopée des Etats-Unis	recommande :	2 heures 1/2.
— hollandaise	—	: 2 heures 1/2.
— hongroise	—	: Plusieurs h. (3 heures).
		(Agiter toutes les 10 minutes).
— italienne	—	2 heures environ.
— japonaise	—	: 2 heures.
— norvégienne	—	: 2 heures.
— portugaise	—	: 6 heures.
		(Agiter toutes les 15 minutes).
— roumaine	—	: 2 à 3 heures.
— suédoise	—	: 2 heures.
— suisse	—	: 1 heure.
— U. R. S. S.	—	: 4 heures.
— yougoslave	—	: 4 heures.

Le temps de digestion, et par conséquent la durée du titrage, varie donc, suivant les pharmacopées, entre 1 heure et 6 heures. On ne peut manquer d'être frappé, dès maintenant, de cette discordance sur une des conditions principales de la régularité de l'Essai.

VI) RESULTAT FINAL DE LA DIGESTION

C'est cependant ici que nous constaterons le maximum de désaccord entre les pharmacopées. Celles-ci se montrent, en effet, plus ou moins exigeantes sur la disparition partielle ou totale du protéide choisi. Et, en général, elles ne préconisent aucun moyen de contrôle ou de vérification de la protéolyse, laquelle

se passe au sein d'une solution qui, suivant les cas, est plus ou moins limpide en fin d'opération.

Ainsi :

- En France, on demande : La disparition complète de la Fibrine. (Et on s'en assure par l'épreuve de la touche azotique).
- En Allemagne, on demande : « Qu'il ne reste en suspension que quelques flocons jaunâtres ».
- En Angleterre, on demande : « Qu'il n'y ait plus de granulations et que le liquide soit opalescent ».
- En Autriche, on demande : Une liqueur un peu opalescente.
- En Belgique, on demande : La dissolution de l'ovalbumine, en donnant un liquide opalescent.
- En Espagne, on demande : « Qu'une prise d'essai ne donne pas de précipité avec 10 à 20 gouttes de NO^3H ».
- Aux Etats-Unis, on demande : La comparaison de l'albumine non dissoute avec une solution de Pepsine étalon, soit la dissolution incomplète de l'ovalbumine.
- En Hollande, on demande : La dissolution complète de l'ovalbumine.
- En Hongrie, on demande : La dissolution complète de l'ovalbumine.
- En Italie, on demande : Un liquide limpide, avec seulement quelques flocons gélatineux. (En prolongeant la digestion pendant 10 heures, le liquide filtré et porté à l'ébullition ne doit pas précipiter).
- Au Japon, on demande : La dissolution complète de l'ovalbumine.

En Norvège, on demande : Un liquide clair.

Au Portugal, on demande : La disparition complète de l'ovalbumine. (Touche azotique, comme en France).

En Roumanie, on demande : « Qu'il ne reste en suspension que quelques flocons ». (Après 5 heures, touche azotique).

En Suède, on demande : Un liquide clair.

En Suisse, on demande : « Que le trouble de la caséine digérée, après addition d'acétate de soude, soit, au plus, égal à celui du liquide de comparaison. »

En U. R. S. S., on demande : « La dissolution totale, avec seulement quelques peaux jaunâtres à demi transparentes, non dissoutes. »

En Yougo-Slavie, on demande : La dissolution avec quelques flocons blanc-jaunâtres, non dissous.

On voit ainsi, avec étonnement, que, si la plupart des pays : France, Angleterre, Autriche, Belgique, Espagne, Hollande, Hongrie, Japon, Norvège, Portugal, Suède, Suisse, exigent la dissolution complète du protéide de leur choix, c'est-à-dire une solution tout au plus opalescente et par conséquent une digestion totale apparente, d'autres : Allemagne, Etats-Unis, Italie, Roumanie, U. R. S. S., Yougo-Slavie tolèrent la présence de quelques flocons de protéide non dissous et admettent ainsi une digestion plus ou moins partielle, qui ne saurait convenir à un essai aussi délicat.

L'épreuve de la *touche azotique*, recommandée et utilisée depuis longtemps en France¹, n'est pratiquée que par la France, l'Espagne, le Portugal et la Roumanie.

Nous avons résumé toutes les méthodes de titrage qui viennent d'être décrites, dans le tableau comparatif suivant :

(1) PORTES. A propos de l'Essai des Pepsines. *J. Ph. Ch.*, 1911, (7^e s.), 3, p. 341 à 343.

Tableau comparatif des méthodes de titrage de 0 gr. 10 de pepsine
dans les différentes Pharmacopées.

Pays	Protéide	Poids (a)	Solut. acide	Durée	Tempér.	Touche azotique	HCl
Allemagne ...	Oval.	10 grs (10')	100 cc. 5	3 h.	45°	Non	dil.
Angleterre ...	Oval.	12,50 (15')	100 cc.	6 h.	40°-41°	Non	pur. 0 cc. 5
Autriche	Oval.	10 grs	100 cc.	4 h.	40°	Non	50 cc.
Belgique	Oval.	10 grs	90 cc.	2 h.	50°	Non	1 à 6 cc.
Danemark	0	0	0	0	0	0	3 grs 50
Espagne	Oval.	10 grs	102 cc. 5	6 h.	40°	Oui	0
Etats-Unis	Oval.	10 grs (15')	50 cc.	2 h. 1/2	52°	Non	2 grs 50
France	Fibri.	2 grs 50	60 cc.	6 h.	50°	Oui	150 cc.
Grèce	0	0	0	0	0	0	1 gr. 50
Hollande	Oval.	15 grs (5')	150 cc.	2 h. 1/2	45°	Non	0
Hongrie	Oval.	10 grs (10')	95 cc.	3 h.	40°	Non	0,14
Italie	Oval.	10 grs	105 cc.	2 h. env.	38°-40°	Non	2 cc.
Japon	Oval.	10 grs (8')	100 cc.	2 h.	50°	Non	5 cc.
Norvège ...	Oval.	10 grs (10')	100 cc.	2 h.	45°	Non	3 cc.
Portugal	Oval.	10 grs (15')	100 cc.	2 h.	40°-45°	Oui	0,40
Roumanie ...	Oval.	10 grs (5')	100 cc.	6 h.	40°-45°	Oui	2 grs
Suède ...	Oval.	10 grs (10')	100 cc.	2 à 3 h.	40°-45°	Non	3 cc.
Suisse	Caséi.	8 grs 33	10 cc.	1 h.	40°	Non (b)	0 cc. 26
U. R. S. S. ...	Oval.	10 grs (10')	100 cc.	4 h.	40°-47°	Non	1 gr.
Yougoslavie ..	Oval.	10 grs (10')	100 cc.	4 h.	45°	Non	10 gttes

a) Le nombre 5' ou 10' signifie le temps exigé pour la coction de l'ovalbumine.

b) Touche acétique.

CHAPITRE III

CRITIQUE DES ESSAIS DE PEPSINE DANS LES DIFFERENTES PHARMACOPEES

Examinons chacun des éléments de titrage que nous avons énumérés au Chapitre précédent.

I) *PROTEIDE*

Trois sortes de protéides sont utilisées par les pharmacopées pour l'essai de la pepsine : la Fibrine, la Caséine et l'Ovalbumine. Nous décrirons les avantages et les inconvénients de chacun d'eux.

Fibrine. Proposée par CORVISART, puis par GUTBOURT au nom de la Société de Pharmacie de Paris, son emploi figure depuis 1866 au Codex français.

Elle présente l'avantage d'être facilement digérée par la pepsine; mais il est difficile, surtout aux pharmaciens de campagne dont l'agglomération est dépourvue d'abattoirs, de se la procurer.

De plus, la fibrine de porc, qui a été celle choisie par le Codex, de préférence à celles de cheval, de mouton, de veau ou de bœuf (plus lentement pepto-

nisées, surtout la dernière), résiste elle-même plus ou moins à la digestion pepsique, suivant l'âge et l'état de santé de l'animal dont elle provient.

On l'emploie fraîche ou sèche.

Fraîche. De préparation facile (V. p. 25 et 30), elle présente l'inconvénient de retenir dans ses filaments une quantité d'eau plus ou moins importante, qui peut gêner ultérieurement les opérations de titrage. De plus, sa conservation n'est pas indéfinie : même en milieu chloroformé ou glyciné, elle subit des phénomènes d'autodigestion, qui faussent les résultats, au cours d'essais plus ou moins espacés. A la glacière, sous l'influence de ses propres diastases, elle ne tarde pas à se prendre en une gelée transparente, d'odeur épouvantable.

Sèche. Aussi a-t-on pensé à la dessécher et à l'employer sous cet état. (Initiative de M. MACQUAIRE, d'après P. E. THIBAUT¹). L'opération s'effectue à 40°, soit à l'étuve, soit dans un courant d'air sec.

Malheureusement les fibrines livrées par le commerce ont été souvent desséchées à *plus haute* température et se montrent, de ce fait, rebelles à la digestion pepsique. Là se trouve peut-être l'explication d'échecs enregistrés avec la fibrine sèche.

De plus, il existe sur le marché des fibrines en poudre qui donnent avec l'eau une pâte gris-sale, et des fibrines sous forme de granulé, dont la constitution ne semble pas homogène et qui renferment des

(1) P.-E. THIBAUT. Etude des préparations officinales de pepsine inscrites au Codex de 1884. *Th. D. Ph., Paris*, 1902.

impuretés (fibres et particules végétales). Quoi d'étonnant, dès lors, à ce qu'on ait constaté que 2 fibrines de provenances différentes aient accusé une différence de digestibilité de 30 %, quand on les soumettait à l'influence de la même pepsine.

Certains Laboratoires spécialisés prétendent que, pour obtenir des résultats constants, il est prudent de changer la fibrine tous les mois. Ne peut-on craindre que, même pendant ce délai pourtant réduit, comme la fibrine fraîche et pour les mêmes causes, elle ne soit l'objet de phénomènes d'auto-digestion ?

Il y a 20 ans, DELAUNAY¹ montrait qu'une même pepsine pouvait être estimée excellente, bonne ou mauvaise, suivant l'état de la fibrine sèche employée pour son titrage. Il citait déjà le cas d'une pepsine à laquelle on pouvait, dans ces conditions, attribuer des titres de 125, 100 et 55.

On n'est pas plus avancé aujourd'hui et il faudra attendre quelque temps encore pour apprécier à sa valeur le remède proposé par M. PÉNAU au Congrès International de Bruxelles, soit l'emploi d'une fibrine standard².

Pour terminer ces considérations sur la fibrine, notons qu'en France 2 grs 50 de produit *sec* sont prescrits et correspondent à 10 grs de produit *frais*. Si la fibrine desséchée est elle-même remplacée par

(1) R. DELAUNAY. Sur l'essai de la pepsine off. *La Pharm. fran.*, Mars 1914, 18, p. 81 à 85.

(2) PÉNAU. Congrès International de Pharmacie, Bruxelles, 1935.

la fibrine essorée, il faut ramener la quantité d'eau distillée de 58 grs 50 à 51 grs ¹.

Retenons aussi que le Codex français 1908, pour la préparation du Soluté de Peptonate de Mercure, délaisse la Fibrine au profit de l'Ovalbumine. Il ne coagule pas cette dernière au préalable, comme le font toutes les pharmacopées utilisant ce protéide et ne fixe pas de durée de digestion ².

Par contre, l'Angleterre qui utilise l'Ovalbumine pour l'essai de la pepsine, choisit la Fibrine carminée pour le test d'identité de ce ferment ³.

Caséine. La Pharmacopée helvétique, qui est la seule à employer ce protéide ne donne pas d'indications à son sujet.

Nous savons seulement qu'elle est d'abord mise en solution avec de la soude caustique N/10 et de l'eau distillée. L'enzyme est ensuite ajouté dans des proportions de dilution telles que le titrage final s'effectue au moyen des chiffres suivants : 0 gr. 0012 de Pepsine sur 0,01 de Caséine !!

La Caséine essayée par beaucoup de pharmacologues, présente l'avantage d'être facilement extraite du lait. (Voir p. 30). Comme la fibrine, on l'a employée

(1) 2 grs 50 également de fibrine sèche étalon dans le Codex 1937; mais pour 5 cc. d'une solution de pepsine à 1 %, soit 0,05 de ferment au lieu de 0,10 dans le Codex 1908.

(2) Ce Soluté est supprimé au Codex 1937.

(3) L'essai d'identité de la pepsine que la Ph. Brit. recommande avant le titrage consiste à faire digérer par la pepsine une fibrine colorée préalablement en rouge par une solution ammoniacale de carmin. Toute cette matière colorante passe dans le liquide à la fin de la digestion du protéide par le ferment et caractérise ainsi ce dernier.

fraîche ou sèche, mais les résultats ont été peu encourageants.

Fraîche. Au cours de sa préparation, en effet, l'expression du coagulum peut être plus ou moins énergique et la caséine obtenue peut, par conséquent, renfermer plus ou moins d'humidité : sa digestion en est, dès lors, plus ou moins rapide.

Sèche. Pour éviter l'inconvénient dû aux différents degrés d'hydratation des échantillons utilisés, on a utilisé la caséine *sèche*, que l'industrie livre facilement.

Là encore les résultats furent peu encourageants, par suite des différents modes de dessiccation et certainement (comme pour la fibrine) à cause de l'excès de chaleur atteint au cours de cette opération : la caséine desséchée à *haute* température devenant, elle aussi, réfractaire à l'hydrolyse fermentaire, comme tous les protéides d'ailleurs.

Il est probable que la Pharmacopée helvétique préfère une caséine desséchée à basse température (40°); mais, en tous cas, elle ne le spécifie pas.

Cette méthode à la caséine, quoique peu répandue, compte cependant ses partisans. Ainsi le procédé de GREENBERG¹ est basé sur l'hydrolyse de ce protéide et le titrage, selon SÖRENSEN, des groupements acides peptidiques libérés. On effectue un dosage semblable sur un témoin : la différence entre les 2 dosages indique l'acidité libérée par l'activité protéolytique du ferment.

(1) L. GREENBERG, The assay of Pepsin. *Journ. amer. pharm. Assoc.*, 1931, 20, 1032 à 1036.

Deux autres auteurs américains¹ ont également imaginé une méthode sur le principe suivant : La caséine se combine à une quantité définie d'acide chlorhydrique et cet acide est libéré en quantité plus ou moins grande lors de la digestion de ce protéide par la pepsine. On le titre alors alcalimétriquement.

Nous avons essayé ce procédé sans succès.

Un procédé semblable est dû à ESCHENBRENNER² : La caséine est mise au bain-marie, à 40°, pendant une heure avec des quantités croissantes de pepsine : 2 cc., 4 cc., 9 cc. de solution préparée à l'avance. On fait le titrage des diverses acidités finales.

Dans ces 3 procédés, les quantités d'acide trouvées à l'analyse permettent de déterminer l'activité de la pepsine essayée.

Enfin d'après Olaf WEIDER³, la méthode à la caséine de GROSS pourrait, avec quelques remaniements, remplacer celle à l'ovalbumine de la pharmacopée allemande, identique elle-même à celle de la pharmacopée norvégienne de 1913.

Cette méthode qui semble officieusement très en faveur en Allemagne et dans les pays d'influence germanique, emploie la caséine pour le titrage des vins de pepsine. D'après elle, ESCHENBRENNER (*loc. cit.*) en conclut que le vin de pepsine est une préparation inefficace et devrait être rayé de la liste des produits officinaux.

(1) JENKINS et HOSHALL. The assay of Preparations containing pepsin official in the national formulary. *Journ. Amer. Pharm. Assoc.*, 1933, 22, 625 à 637.

(2) ESCHENBRENNER. Über Pepsin Präparate. *Pharm. Zeit.* 81, 790 et 967, 1936.

(3) WEIDER. Einige Untersuchungen über Pepsin und Pepsin-Präparate. *Norsk Farmaceutis Tidsskrift*, 1933, N° 18, p. 291.

Elle consiste (plus ou moins modifiée) ¹ à faire agir des quantités de 0,00062 à 0,02 de pepsine de titre différent sur 0,01 de caséine pendant 15' à 40', et à précipiter la caséine non digérée. On compare les troubles obtenus.

Ovalbumine. Protéide utilisé à peu près dans toutes les pharmacopées (sauf en France et en Suisse); et en quantité équivalente (10 grs) dans tous les pays, sauf en Angleterre (12 grs 50) et en Hollande (15 grs).

L'entente cesse quand il s'agit du temps nécessaire à la coagulation du poids prescrit : ce temps oscille entre 5', 8', 10' et 15'. Seule, la Belgique recommande de presser le produit entre 2 filtres pour enlever l'excès d'eau.

D'emploi facile, le blanc d'œuf est un protéide que l'on a toujours, et rapidement, sous la main. Toutefois, d'après BACHSTÉZ ² « en temps ordinaire, l'examen au blanc d'œuf ne réussit pas la plupart du temps. Et en temps de crise, une autre méthode deviendrait une nécessité, vu la pénurie d'œufs qui en résulterait (*sic*) » !!!

Il a du moins sur la fibrine l'avantage de donner, après digestion, une solution limpide et, sur la caséine, celui d'être plus rapidement digestible; mais ses inconvénients, qui l'ont d'ailleurs fait rejeter chez nous, sont multiples.

En premier lieu, il se prête mal aux manipulations,

(1) BRUMMING, Zur Prüfung von Pepsin und Pepsinwein. *Apoth. Zeit.*, 1929, 44, 964.

(2) M. BACHSTÉZ. Beitrag zur Bewertung des Pepsins. *Pharm. Zentralhalle*, 1920, 61, p. 479 à 481.

à cause de sa consistance spéciale; et, lorsqu'il est cuit, il est plus ou moins facilement attaqué par l'enzyme. De plus, l'âge des œufs (au moins 5 jours et pas plus de 12 jours), leur forme et leurs dimensions; la race et la nourriture des poules, la saison, peuvent jouer un rôle lors de la coction et par contre-coup, modifier la protéolyse¹.

3 points dominent son emploi :

Sa coagulation.

Sa tamisation.

Sa désagrégation.

Coagulation. BRANCAZ² a calculé que, coagulé pendant 5' seulement, il est aussi facilement peptonisé que la fibrine et sa digestion est totale en 6 heures (ressemblance avec la fibrine fraîche).

Coagulé pendant 10', sa digestion est plus ou moins retardée. A plus forte raison, l'est-elle à des temps plus longs de coagulation. Le simple bon sens permet de supposer une désagrégation sensiblement plus lente ou moins complète d'un blanc d'œuf rendu plus compact par une cuisson plus prolongée.

Tamisation. L'inconvénient précédent s'accompagne toujours naturellement d'une division et d'une tamisation, qui en est souvent le complément, plus difficiles.

Or, plus le protéide est divisé, plus grande est sa

(1) A. STASIAK et B. KERÉNYI. Über die Westbestimmung pharmazeutische Pepsinpräparate. *Pharm. Zentralhalle*, 1933, 74, p. 519 à 523 et p. 531 à 537.

(2) BRANCAZ. *Loc. cit.*

surface de contact avec l'enzyme et, par conséquent, meilleure est la protéolyse.

Aussi quelques pharmacopées étrangères, qui utilisent l'ovalbumine, mettent-elles grand soin à cette opération. Les Belges recommandent le tamis N° 10; les Anglais, le tamis à 12 mailles au cm.; les Américains, le tamis N° 40; les Hongrois, le tamis N° IV, ainsi que les Roumains et les Yougo-slaves; les Portugais, le tamis de 144 mailles correspondant à notre N° 52.

Désagrégation. L'Angleterre et les États-Unis, plus méticuleux encore, et pour éviter que les fragments d'ovalbumine tamisée ne se réunissent à nouveau, prescrivent de désagréger l'ensemble avec un agitateur rodé, à bout de caoutchouc.

Ces 2 opérations de tamisation et de désagrégation sont, à notre avis, absolument indispensables pour le titrage de la pepsine à l'ovalbumine. Nous avons nous-même effectué plusieurs essais de pepsine suivant la méthode au blanc d'œuf de l'ancienne pharmacopée helvétique (Ph. IV) : les résultats ont toujours été différents et très améliorés avec une albumine très finement divisée et tamisée après la cuisson.

Et cependant, malgré ce luxe de précautions, a-t-on le droit de considérer comme comparables et identiques deux titrages de la même pepsine effectués : l'un à Bruxelles avec *10 grs d'Ovalbumine cuite 10', tamisée et passée entre 2 papiers-filtres et l'autre à Londres avec 43 gr. 10 d'Ovalbumine, cuite*

15, tamisée, désagrégée, mais non séchée entre 2 papiers-filtres ?

Car, si l'on constate avec satisfaction le soin apporté par certains pays à la division de l'albumine coagulée (il conviendrait d'adopter partout le tamis de 15 mailles au cm., mais, là aussi, que de désaccords internationaux), il faut déplorer qu'une seule nation, la Belgique, tienne compte de l'humidité de l'ovalbumine. Celle-ci est considérable et le titrage sera différent si l'on recueille le protéide sur une assiette ou si l'on absorbe l'excès d'eau entre deux feuilles de papier à filtrer.

Ainsi, STASIAK et KERENYI¹, dans de multiples expériences, ont tenté de mesurer dans une éprouvette conique, la hauteur d'ovalbumine non digérée. Dans des conditions de travail absolument identiques, ils ont trouvé, pour une même pepsine :

3 cc. 3; 3,5; 2,7; 3,4; 2,1; 2,5; 2,5; 3,5; 1,5; 1,9; 1,6; 1,7.

Dans une autre série d'essais, « avec une technique rigoureusement constante et un substratum soigneusement homogénéisé »,

0,10; 0,15; 0,20 et 1 gr. de pepsine.

ont abandonné, après 2 heures, et dans l'ordre :

1 cc. 6; 1 cc. 1; 1 cc. 0; 0 cc. 6 d'ovalbumine non digérée.

Ces différences ont évidemment une cause : les auteurs précédents les signalent sans les expliquer².

(1) STASIAK et KERENYI. *Loc. cit.*

(2) On voit d'après ces chiffres qu'il n'y a pas proportionnalité entre la hauteur de l'ovalbumine non digérée et le poids de la pepsine essayée, puisque 0,10 de ferment laissent déposer 1 cc. 6; 0,20 : 1 cc. 0 et 1 gr. : 0 cc. 6; alors que, théoriquement, les auteurs pensaient probablement obtenir : 1 cc. 6; 0 cc. 8 et 0 cc. 16.

Pour conclure ces quelques critiques relatives aux protéides utilisés dans l'essai de la pepsine, retenons, que, d'après Olaf WEIDER¹, la méthode à l'ovalbumine de la pharmacopée allemande est préférable à celle de la pharmacopée autrichienne et que, d'après GEISSLER :

1) Dans des conditions d'expériences identiques, la *fibrine* est plus facilement digérée que *l'albumine*.

2) Un *même* poids de fibrine ou d'albumine, préparée de la *même* façon, ne renferme pas toujours la *même* quantité de substance sèche : le résidu sec varie de 20 à 30 % pour la fibrine et de 12,9 à 14,6 % pour l'albumine.

3) L'ovalbumine ne donne des résultats concordants que lorsqu'elle a été soumise à la coction pendant un laps de temps déterminé et surtout lorsqu'elle est divisée, au moyen d'un crible, en fragments toujours de la même grosseur.

Disons enfin quelques mots de quelques autres protéides qui auraient pu être choisis par les pharmacologues et pourquoi on les a rejetés.

La *gélatine* a été préconisée par M. ARTHUS et SIEGWART², pour doser la pepsine, par mesure de la viscosité du produit en fin de digestion (vitesse d'écoulement). On trouve la gélatine dans toutes les officines; mais elle se prête malheureusement mal à la peptonisation. Au bout de 6 heures, celle-ci n'est pas encore terminée.

(1) WEIDER. *Loc. cit.*

(2) ARTHUS et SIEGWART. Pour doser la pepsine. *C. R. Soc. Biol.*, 1918, 81, 957.

L'*albumine sèche* a donné de médiocres résultats, imputables certainement, comme pour la fibrine et la caséine, à son mode de préparation, pas très bien déterminé et surtout à un degré de température de séchage mal défini.

L'*albumine coagulée* par la chaleur en présence d'un acide (acétique) a été essayée par DISDIER¹. Mais sa préparation préalable est longue et sa digestion exige presque autant de temps que celle de la fibrine.

Signalons aussi la méthode de SPRIGGS, dont le principe est la diminution de la viscosité d'une solution albumineuse pendant la digestion pepsique².

La *ricine*, le *sérum humain* ou *animal* ont été également essayés.

Aucune de ces propositions n'a rencontré de succès auprès des différents corps pharmaceutiques.

II) VOLUME D'EAU ACIDULEE

Sans avoir une importance considérable, cette question mérite cependant de ne pas être négligée : il y a longtemps qu'une expérience de MACQUAIRE³ a démontré que le pouvoir peptonisant est en raison inverse de la densité du milieu digestif.

Sans accorder à cette affirmation plus de valeur qu'elle ne mérite, et surtout sans en tirer trop de

(1) DISDIER. Contribution à l'étude de la digestion pepsique. *Th. D. Ph.*, Paris, 1904.

(2) SPRIGGS. *Zeit. f. physiol. Eine neue methode zur Bestimmung der Pepsinwirkung Chem.*, Strassburg, 1902, XXXV, 465-495.

(3) MACQUAIRE. *Loc. cit.*

conclusions, nous estimons que la quantité de 100 cc. est la meilleure, surtout en ce qui concerne le titrage à l'Ovalbumine. C'est d'ailleurs à ce chiffre que se sont arrêtées la plupart des pharmacopées¹.

III) ACIDE

En 1866, le Codex français recommandait l'acide lactique : ce n'est que depuis 1884, qu'il choisit l'acide chlorhydrique et tous les pays du monde ont suivi notre exemple.

A la suite des travaux de DISDIER¹, qui a constaté qu'en solution chlorhydrique, à 50°, la pepsine subit « une diminution d'activité d'autant plus grande que le contact est plus prolongé », le Codex 1908, revenant sur ses prescriptions antérieures, conseille de n'ajouter l'enzyme à la solution acide qu'en tout dernier lieu, soit au moment où celle-ci a atteint la température de 50°. Quelques autres pays ont imité son exemple³.

Nous avons dit précédemment ce qu'il fallait penser des différents acides chlorhydriques purs ou dilués des diverses pharmacopées et nous avons conclu que, malgré certaines apparences, tous les essais proposés s'effectuent en somme à un pH convenable : c'est-à-dire que la quantité d'acide donne partout un

(1) Le volume est cependant au Codex 1937, de 60 cc. eau bidistillée + 4 cc. 3 HCl N. + 5 cc. solution de pepsine, soit au total 69 cc. 3. Il était de 60 cc. au Codex 1908.

(2) DISDIER. *Loc. cit.*

(3) Le Codex 1937, à nouveau, néglige ces remarques et utilise HCl N (4 cc. 3), qu'il mélange à l'Eau distillée dès le début de l'essai.

milieu correspondant au pH de l'activité optimum de la pepsine, soit 1,5-2.

IV) TEMPERATURE DE DIGESTION

Les pharmacopées, nous l'avons vu, comme pour l'acide chlorhydrique, varient peu à ce sujet.

La température de 38°-40° a l'avantage de se rapprocher de la température physiologique de la digestion et c'est à ce titre, certainement, que l'ont adoptée les pharmacopées anglaise, autrichienne, espagnole, hongroise, italienne, portugaise, roumaine, suédoise, suisse et soviétique. Mais on ne doit pas oublier que la température de 50°-52° (France, Belgique, Etats-Unis, Japon) est celle de l'activité optimum de la pepsine¹. Beaucoup d'auteurs étrangers (KEHLER, SCHENK² considèrent la température de 40°, comme trop basse et préconisent celle de 52°.

Quelques auteurs français ont insisté sur l'importance de cette température et sur les moyens de l'obtenir. PORTES, puis THIBAUT³ assurent que la température de 50° *doit être rigoureuse* et qu'à 47°, par exemple, l'essai ne peut être concluant.

Le premier de ces pharmacologues conseille le bain-marie, plutôt que l'étuve, pour éviter d'ouvrir cette dernière au moment de l'agitation du flacon, et de risquer ainsi une diminution de quelques degrés. Il

(1) Température inchangée (50°) au Codex 1937.

(2) KEHLER, SCHENK. Dosage de la pepsine. *Schw. Apoth. Zeit.* 1911, 2, p. 17.

(3) *Loc. cit.*

ajoute que le bain-marie est plus facile à trouver dans un laboratoire qu'une étuve.

V) DUREE DE LA PROTEOLYSE

Une durée de 6 heures gêne évidemment beaucoup le praticien et BYLA, pour y remédier, avait en 1910, déjà, proposé un essai rapide d'une heure.

Il est clair aussi que les résultats du titrage peuvent être différents, si l'on arrête la digestion plus ou moins prématurément. Citons l'exemple de l'Italie, qui recommande 2 heures environ, mais qui déclare « qu'en prolongeant la digestion pendant 10 heures, le liquide filtré et porté à l'ébullition ne doit pas précipiter », c'est-à-dire que l'ovalbumine doit être complètement digérée.

En faveur d'une durée de 2 ou 3 heures, plaide le processus digestif des protéides dans l'organisme, qui est précisément de cet ordre. Mais, *in vitro*, il faudrait pour la commodité de tous, l'adoption de la durée d'une heure.

Un mot enfin de *l'agitation* prescrite dans presque tous les titrages à l'ovalbumine, et d'ailleurs avec des exigences différentes. Certaines pharmacopées recommandent d'agiter toutes les 5' (ce qui représente en Angleterre 72 agitations !!); d'autres, tous les 1/4 d'heure, ou « fréquemment », etc.

N'oublions pas qu'une agitation trop fréquente nuit à la protéolyse et que, par contre, une agitation trop

espacée ne répartit pas suffisamment les produits formées¹.

L'essai à l'ovalbumine est, de ce fait, le plus absorbant de tous.

VI) RESULTAT FINAL DE LA DIGESTION

Il est impossible de se contenter des approximations de certaines pharmacopées étrangères. La dissolution *plus ou moins complète* du protéide qui suffit à les satisfaire : flocons jaunâtres restés en suspension, quelquefois hauteur de l'albumine non dissoute dans une éprouvette (Amérique), ne saurait, en aucune façon, être considérée comme le critérium d'une épreuve déjà délicate².

La France, et avec elle 3 autres pays (voir p. 41), va plus loin dans ses exigences. La dissolution *complète* doit être accompagnée de l'épreuve de la touche *azotique*. L'Italie, par contre, a supprimé celle-ci dans sa dernière édition.

Il est bon de préciser pourquoi le Supplément du Codex a cru nécessaire d'indiquer la température de 17°-19°.

(1) Le Codex 1937 maintient une durée de 6 heures et recommande d'agiter fréquemment au début (dissolution de la fibrine), puis ensuite toutes les heures.

(2) HOLMI, (Über die Bestimmung des Pepsins. *Ber. des ungar. pharm. Ges.*, 1935, 11, 621, d'après *Archiv der Pharm.*, 1936) fait une comparaison de la solution digérée avec une solution standard maintenue dans une bouteille thermos à température constante. Il constate une erreur de 15 %.

L'observation est due à PORTES¹ qui a constaté que; pour une même pepsine, à la fin de l'essai :

A 20°, NO³H ne donnerait pas de louche et qu'ainsi une pepsine mauvaise serait excellente.

A 15°, NO³H donnerait un léger louche et la pepsine serait acceptable.

A 10°, NO³O donnerait un précipité abondant et la pepsine serait mauvaise.

Ces affirmations sont sans doute excellentes. En tous cas, ni l'Espagne, ni le Portugal, ni la Roumanie qui, comme la France, utilisent la touche azotique n'en ont tenu compte.

(1) PORTES. *Loc. cit.*

(2) Le Codex 1937 maintient la touche azotique à 17-19°.

CONCLUSIONS

Que déduire de toutes ces critiques ?

1) Que, d'abord comme nous l'avons dit, il conviendrait de se mettre d'accord sur l'activité des pepsines et d'adopter un titre standard international. On l'a fait pour d'autres drogues (digitale, ergot de seigle), évidemment plus dangereuses mais non plus actives.

2) Que le titrage des pepsines devrait être, lui aussi, uniforme ou du moins mieux précisé qu'il ne l'est actuellement.

Il y a quelques années, une pepsine Titre 3.000 américaine fut soumise, presque simultanément à l'appréciation du « Chemische Untersuchungsamt » de la ville de Breslau; au Laboratoire officiel de Chimie de la même ville; à un Docteur en pharmacie, analyste des denrées alimentaires de la même ville et au Laboratoire de Chimie légale de Charlottenburg. Les résultats furent les suivants :

I) Titre inférieur à 100.

II) Titre 200 à 250.

III) Titre 333.

IV) Titre 300.

(Le titre 3.000 américain correspond à notre titre 300) ¹.

Et, en 1901, RUFFIN ² ayant entrepris 20 essais sur

(1) LEGRAND, *Loc. cit.*

(2) *Bull. de la Soc. Ind. du Nord de la France*, 1901.

20 échantillons de pepsine pris au hasard, avait trouvé :

1 échantillon de titre supérieur à 20¹.

3 échantillons au titre 20.

9 — approchant plus ou moins du titre 20 sans l'atteindre.

5 — au titre 10.

2 — à un titre de moins de 10, dont un à un titre de 2 à 3.

Des résultats aussi discordants, quant aux pepsines elles-mêmes et à leur titrage, pourraient vraisemblablement se reproduire aujourd'hui.

Pour y remédier, il faudrait adopter, pour le titrage d'une *pepsine standard* :

— Une durée de digestion d'une heure.

— Une température de 50°.

— Un volume de 100 cc.

— Un pH de 1,8-2.

— Une dissolution *complète* du protéide choisi, et une épreuve complémentaire, en fin de titrage, permettant de le contrôler.

Enfin, et c'est là l'objet du présent travail, un *protéide semblable partout*, facile à obtenir, de prix de revient peu élevé, de bonne conservation, et facilement clivable par la pepsine.

Nous essaierons, dans les Chapitres suivants, de prouver que l'*Edestine*, protéide végétal retiré du Chanvre ordinaire (*Cannabis sativa* L.) répond à toutes ces conditions.

(1) Le titre 20 correspondrait, d'après l'auteur, à notre titre officinal de 100.

DEUXIEME PARTIE

L'EDESTINE

CHAPITRE IV

ORIGINE. CARACTERES

L'Edestine est une globuline végétale cristallisable, que l'on trouve dans les graines de chènevis, dans la proportion de 10 à 13 % environ. Il existe aussi dans les graines de courge, de ricin, de céréales, etc., et dans le melon une globuline végétale qui est vraisemblablement de l'édestine.

Origine botanique.

On donne le nom de Chènevis aux *fruits* du *Cannabis sativa* : plante appartenant à la famille des Cannabinées, groupe des Urticacées, Dicotylédones Apétales unisexuées.

Le genre *Cannabis*, qui forme avec le genre *Humulus*, la petite famille des Cannabinées est représenté par une seule espèce, le Chanvre, plante annuelle, herbacée, à tige cannelée et à feuilles palmatiséquées, opposées à la base et alternes au sommet.

Les fleurs, apétales, régulières, possèdent une odeur spéciale, caractéristique.

L'espèce vivant dans tous les points du globe, a subi des modifications, dues au climat et à l'adaptation qui en résulte. Aussi distingue-t-on généralement 3 variétés.

a) Var. *vulgaris*. Plante toujours herbacée, annuelle; haute de 1 m. 70 environ, à l'inflorescence peu fournie et aux feuilles à 5-7 folioles. C'est le *Cannabis* typique.

b) Var. *sinensis*. Plante très élevée (4 à 6 m.) croissant surtout en Italie.

c) Var. *indica*. Plante à tige assez élevée (2 à 3 m.) à inflorescence très fournie et dont l'emploi en Matière médicale est bien connu.

Les « graines » de chènevis appartiennent à la première variété.

Elles étaient autrefois utilisées comme médicament; on les trouve inscrites aux Codex de 1818, 1837, 1866.

Origine géographique.

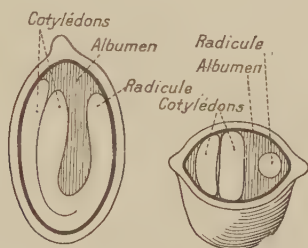
Le *Cannabis sativa* est probablement originaire de l'Asie centrale et occidentale (Mer Caspienne). Il s'est propagé, de là, un peu partout : en Chine, en Europe, en Afrique et en Amérique par l'intermédiaire des esclaves noirs. Il vit dans toutes les régions tempérées et à des altitudes très diverses. A cause de ses fibres et en vue de son emploi industriel, il est l'objet d'importantes cultures en France en particulier. Il exige des terrains humides, riches en humus, avec climats chauds.

Caractères morphologiques.

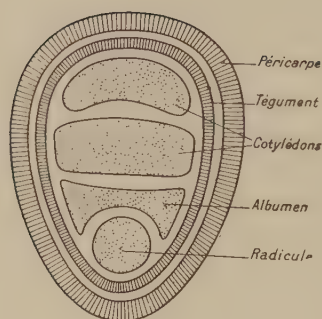
Description des « graines ». Ce sont des akènes grisâtres, uniloculaires, longs de 3 à 6 mm. sur 2 mm. de diamètre, globuleux, plus ou moins renflés au milieu. L'odeur est peu marquée, la saveur fade, huileuse.

Le péricarpe est sillonné extérieurement d'un fin réseau blanchâtre de nervures, plus ou moins visibles, partant toutes de la base pour diverger vers le sommet; il se détache assez facilement en le pressant entre deux doigts.

A la loupe, on peut distinguer, au-dessous du péricarpe dur et cassant, une seule graine composée : d'un tégument mince, vert-clair, allongé en carène, pourvu d'une grosse nervure dorsale et se détachant facilement; d'un embryon recourbé en forme de crochet; de deux cotylédons épais; d'une tigelle rabattue sur les cotylédons et d'un albumen blanc, charnu, huileux, d'odeur nulle, de saveur oléagineuse, douceâtre.



Section longitudinale et transversale du fruit de *Cannabis*.



Section transversale schématique et agrandie du même fruit.

Caractères anatomiques.

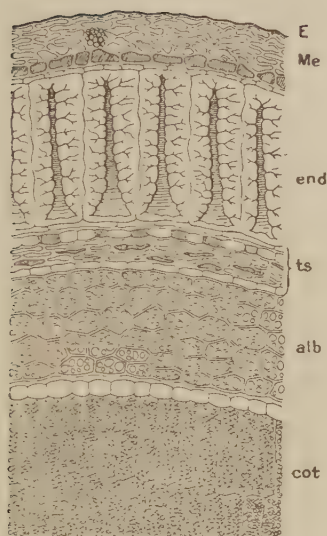
Au *microscope*, une coupe transversale montre :

Péricarpe :

1) Un épicarpe formé de cellules rectangulaires, aplaties, brunâtres, recouvertes par une cuticule épaisse et brunâtre; et à parois latérales ondulées et criblées.

2) Un mésocarpe, composé d'un tissu parenchymateux parcouru par de nombreux petits faisceaux; d'une couche pigmentaire brune, à cellules à parois ondulées et enfin d'une couche de cellules extrêmement petites, non colorées, caractérisées par de fines pointes sur leurs parois internes.

3) Un endocarpe, représenté par une assise de cellules palissadiques, à parois épaisses, longues de $150\ \mu$.



Coupe transversale du péricarpe et de la graine de *Cannabis*.
(d'après Eug. COLLIN et Em. PERROT, Les Résidus Industriels,
Paris 1907).

Graine. Au-dessous de cet endocarpe, on distingue :

1) Un spermoderme, formé de deux téguments : l'un composé d'une seule assise de cellules blanches ou brunâtres; l'autre formé de plusieurs assises de cellules fortement écrasées.

2) Un albumen, dont les cellules polygonales, sont riches en huile et en grains d'aleurone ($8\ \mu$) avec cristalloïdes et globoïdes.

3) Les cotylédons, recouverts de leur épiderme propre, et constitués par des éléments allongés radialement, puis, dans la partie centrale, par des éléments polyédriques, avec huile et aleurone.

Composition du Chênevis.

Si l'on broie grossièrement 5 gr. de ces akènes au mortier et si on les fait digérer pendant une demi-heure, au bain-marie, à 60°, avec 25 cc. d'une solution de chlorure de sodium à 10 %, on obtient, après filtration et refroidissement, un précipité assez abondant d'*édestine*.

Les cristaux ainsi obtenus ont, au microscope, l'apparence d'octaèdres assez caractéristiques.

Ils s'y montrent souvent mélangés de globules d'huile et de débris végétaux.

Les graines renferment, en effet, une importante quantité de matières grasses (35 à 44 %), que l'on peut extraire sous le nom d'*Huile de Chênevis*. Cette huile, verdâtre, siccative, d'odeur et de saveur fortes et désagréables, a un poids spécifique de 0,927 à 0,930 et peut être utilisée pour l'éclairage et la fabrication des savons mous.

A côté de l'huile, on trouve encore :

— 1 à 2 % de sucre.

— 1 % de matières résineuses.

— Divers corps : choline, lécithine, émulsine, trigonelline. On a signalé enfin¹, que l'extrait éthéré renfermerait la vitamine E.

(1) B. SURE. The existence of the reproductive dietary compter (Vitamin E) in the ethereol extracts of yellow corn, wheat embryo, and hemp-seed. *J. of biol. Chem.*, 1924, 62, p. 371.

EXTRACTION

Extraite pour la première fois en 1881, par RITTHAUSEN¹, puis par OSBORNE², l'Édestine peut s'obtenir assez facilement et en quantité par le procédé suivant, dans lequel nous avons tenu compte des observations et des expériences de ces deux auteurs.

Principe. Les fruits de Cannabis sont traités par une solution de chlorure de sodium ordinaire. L'Édestine y forme une combinaison avec le radical acide de ce dernier : il se produit un chlorure insoluble dans l'eau et un bichlorure soluble dans l'eau³. Pour l'obtenir *pure* à partir de ces sels, on opère par neutralisation au moyen d'alcali très étendu. Elle cristallise alors abondamment.

Quantités. Pour préparer 100 gr. d'Édestine pure, il faut employer :

1.500 gr. de chènevis.

16.000 gr. de benzène.

1.300 gr. de chlorure de sodium ordinaire.

5 gr. d'hydroxyde de baryum.

50 gr. d'alcool absolu.

Matériel. Une glacière.

Une étuve chauffée à 60°.

Les ustensiles ordinaires de laboratoire.

Marche de l'opération.

1) *Dégraissage.* On pèse 1 kg. 500 de graines de

(1) H. RITTHAUSEN. Krystallinische Eiweisskörper aus verschiedenen Oelsamen. *J. für prakt. Chem.*, 1881, 23, p. 481-486.

(2) T. B. OSBORNE. Crystalline Proteid of Hemp-seed. *Amer. Chem. J.*, 1892, 14, p. 671.

(3) HOPPE-SEYLER. *Zeit. f. phys. Chem.*, 1910, p. 269.

chênevis « monstre choix » (gros grains pour perroquets) que l'on broie dans un moulin ordinaire. On obtient une poudre grossière, grasse, d'odeur spéciale et de couleur grisâtre. L'aspect est celui d'une farine de lin sale.

On laisse macérer cette poudre, pendant 2 heures, avec 2 litres de benzène. On décante et on filtre sur Buchner. Le liquide est d'abord trouble, jaune verdâtre, puis il devient clair, assez huileux.

Le résidu est repris, dans les mêmes conditions par 2 litres de benzène. Et l'opération se renouvelle ainsi jusqu'à ce qu'une prise d'essai de benzène ne laisse aucun résidu à l'évaporation. Ce solvant n'entraîne alors très probablement que de la chlorophylle.

Il faut en général 8 à 10 extractions.

Le benzène contenant l'huile est alors distillé et peut être employé à nouveau. L'huile est également utilisable.

1.500 gr. de chènevis déshuilés selon cette technique subissent une perte de poids d'un tiers environ (500 gr.).

2) *Cristallisation*. Les graines ainsi dégraissées sont séchées et pilées grossièrement au mortier. Elles sont ensuite traitées dans une grande capsule de porcelaine par 15 litres d'eau contenant 3 % de Na Cl ordinaire, soit 450 gr. On chauffe jusqu'à 60°, en remuant continuellement. On répète cette opération une seconde fois; on utilise donc en tout 900 gr. de chlorure de sodium ordinaire. Il se produit une mousse abondante, au cours de ce traitement.

On arrête alors le feu et on ajoute au liquide 45 cc. environ d'une solution saturée de baryte (quantité correspondant à 3 gr. environ d'hydroxyde de baryum).

On filtre la solution *chaude* pour la débarrasser complètement des débris de graines qu'elle pourrait contenir. Si les premières portions du filtrat sont troubles, on les reverse sur le filtre de toile (Au cas où le liquide n'est pas encore clair, on le chauffe de nouveau à 60°, et on le passe chaud sur un filtre de papier).

On place à la glacière¹. Le lendemain, l'édestine forme un dépôt dense et cristallin, plus ou moins jaunâtre auquel il convient de faire subir plusieurs purifications.

3) *Purification*. On décante le liquide surnageant, jusqu'à ce que le précipité ne baigne plus que dans deux litres de liquide environ. On ajoute alors 2 litres d'une solution à 20 % de chlorure de sodium ordinaire. Instantanément, l'édestine est remise en solution.

On filtre sur noir animal et le filtrat est chauffé de nouveau à 50° environ. On le dilue avec 8 litres d'eau portée elle-même préalablement à 50°, ce qui donne une concentration finale de 3 % de chlorure de sodium dans la solution.

On replace ce liquide dilué à la glacière et on laisse reposer une nuit.

(1) A ce moment déjà, une légère prise d'essai dans une éprouvette laisse déposer par refroidissement, d'abondants cristaux.

Deuxième purification. Le lendemain, l'édestine est à nouveau cristallisée (8 % environ du poids des graines).

On sépare le liquide surnageant et le précipité est dissous dans la solution de chlorure de sodium à 10 %. On prélève une partie aliquote de la solution ainsi obtenue et on y détermine la quantité de soude N/10 nécessaire pour neutraliser le produit, jusqu'à virage de la phénolphtaléine.

On chauffe alors à 50°. On dilue avec une quantité double d'eau chaude (soit 8 litres), débarrassée au préalable de son gaz carbonique et dans laquelle on a ajouté auparavant la quantité de soude N/10 (environ 50 cc.) nécessaire à la neutralisation.

On replace à la glacière. L'édestine, plus pure, cristallise sous une forme plus blanche.

Troisième purification. Après ces 2 traitements au NaCl, on décante et on essore à basse température, sous un vide peu profond. Si l'on centrifuge, le culot est abondant et assez jaunâtre (Fait pour le moins curieux : sous le frottement d'une baguette de verre, il se liquéfie en devenant très jaune : puis reprend son aspect normal).

On lave le précipité avec 100 cc. de solution glacée de chlorure de sodium à 1 % ; puis on lave 2 fois avec chaque fois, 50 cc. d'eau froide; ensuite 2 fois avec 50 cc. d'alcool absolu; enfin 2 fois avec 50 cc. d'éther sulfurique. On sèche dans le vide.

Le rendement est de 100 gr. d'édestine pure cristallisée, ce qui correspond à 6,6 % du poids des graines de chènevis employées.

Le procédé qui vient d'être décrit se rapproche sensiblement du mode de préparation indiqué par FLORENCE, ENSELME et POZZI¹. Notons que d'après ces auteurs, une édestine est d'autant plus riche en azote qu'elle est plus pauvre en amino-acides cycliques et que son pouvoir absorbant dans l'ultra-violet est plus faible; et que la comparaison du spectre permettrait de s'assurer de l'identité des produits obtenus.

PROPRIÉTÉS

a) *Physiques*. L'édestine se présente sous forme d'une poudre cristallisée de couleur crème, d'odeur nulle, de saveur fade, un peu astringente.

Non hygroscopique, elle se conserve indéfiniment, sans altération.

Comme nous l'avons vu page 70, elle a, au microscope, l'aspect de petits cristaux octaédriques, quelques fois isolés et souvent accolés par 3 et 4, mesurant 10 à 20 μ . Elle constitue donc une exception dans l'histoire des protéides qui, en général, sont amorphes et ne cristallisent pas, comme chacun sait².

Les auteurs varient sur la détermination de son *poids moléculaire*. D'après certains, il serait de 3.680; selon WETSBURG même, les protéides végétaux auraient un poids moléculaire de 138.000 !!! Toute-

(1) FLORENCE, ENSELME et POZZI. Contribution à l'étude des protéides végétaux. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1933, N° 1, 15, p. 135 à 146.

(2) Il existe cependant quelques autres globulines cristallisées, ainsi que nous l'avons vu page 65.

fois, d'après le dosage du soufre, en opérant sur un corps bien cristallisé, on ne trouverait pour l'édestine que : 7.300. De plus récentes recherches de SVEDBERG ont montré que les protéides étudiés par lui ont des poids moléculaires égaux à 34.500 ou à un multiple (2,3 ou 6) de ce nombre. Pour lui, l'édestine aurait ainsi un poids moléculaire de 34.500×6 , soit 207.000 !!

On voit que l'on est loin de tomber d'accord et dans l'impossibilité où nous sommes de nous faire une idée exacte et complète de la structure d'un seul protéide, le plus que nous puissions dire est que le poids moléculaire de l'édestine est, *extrêmement élevé*.

Peut-on dire que son *point de fusion* ?? est à 245°-255°, quand à 218°, la coloration de la substance devient légèrement brunâtre; va en s'accroissant jusqu'à 245°, température à laquelle on enregistre un début de fusion : celle-ci se manifestant jusqu'à 255°, température de fusion totale. Le phénomène s'accompagne d'une augmentation considérable de volume.

Spectre d'absorption. D'après ENSELME¹, l'édestine est d'autant plus riche en azote que sa solution est moins absorbante dans la région ultra-violette. En outre, elle est d'autant moins absorbante qu'elle contient moins de mono-amino-acides phénoliques; de plus, elle présente de profondes modifications de ses courbes spectrales dans l'Ultra-violet, au fur et à mesure que s'élève le pH de ses solutions.

(1) ENSELME. Contribution à l'étude des protéides végétaux. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1933, 15, p. 151.

Le *point iso-électrique* de l'édestine est compris entre 5,5 et 6,0 (HITCHCOCK).

Son *pouvoir rotatoire* (en solution de Na Cl à 10 %) est de $(\alpha)_D = -41^{\circ}70$.

Sa *teneur* en tyrosine, déterminée colorimétriquement par divers auteurs (OSBORNE, GUNTHER, HOHM)¹ serait de 4,3 % et son pourcentage en phénylalanine de 3,93 %.

Solubilité. Comme toutes les globulines, l'édestine est insoluble dans l'eau pure et dans les solvants organiques : alcool, éther, chloroforme. Une suspension d'édestine dans l'eau distillée a un pH de 5.²

Toutefois, dans 10 cc. d'eau additionnés de 3 gouttes d'HCl à 1 %, dix centigrammes d'édestine *pure* doivent se dissoudre, en donnant un liquide limpide ou simplement opalescent. C'est là un test de pureté du protéide.

Elle est soluble également dans l'eau additionnée d'acide lactique et dans des solutions de NaOH ou de KOH diluées. Elle forme probablement, dans ces dernières, des combinaisons d'adsorption, ce qui « ferait d'elle une sorte de base indifférente, à la façon de l'alumine »³. De la combinaison sodique ou potassique formée, il est possible de précipiter l'édestine, à peine modifiée.

(1) FURTH UND FISCHER. Über die Ermittlung des Tyrosingehalts von Proteinen. *Chem. Centrbl.*, 1925, 1, p. 872.

(2) HITCHCOCK. Die Ionisation von Proteidchloriden. *Chemisc. Centr.*, 1933, III, p. 627.

(3) Th. B. OSBORNE. Der basische charakter des Proteinmolekulo und das Verhalten des Etestins zu bestimmten mengen von Saure und Alkali. *Zeit. f. phys. Chem.*, Strassburg, 1901, 33, p. 240-293.

Toutes ces solutions aqueuses sont lévogyres. Elles donnent des précipités abondants avec les sels de mercure, de calcium, d'argent, de fer, de cuivre.

Avec le permanganate, il se produit une décoloration (réduction). On constate les mêmes propriétés avec les sels d'or : utilisées pour une méthode d'essai des solutions d'or colloïdal ¹.

L'édestine est également soluble dans une solution saturée de chlorure, bromure ou iodure de sodium, ainsi que dans les solutions de sels correspondants de potassium.

Mais, en définitive, son meilleur dissolvant est une solution de chlorure de sodium à 5 ou à 10 %.

On prétend enfin que, sous l'action de l'eau ou des acides très étendus, elle se transforme en *édestan*, qui ne cristallise plus.

b) Chimiques.

Sa *composition élémentaire* est la suivante :

EAU 12,9 %
(0,50 d'édestine séchés pendant 3 heures à 100° ne doivent pas perdre plus de 0,05 à 0,065 d'eau).

CENDRES 0,32 %
(Calcinée à basse température, elle ne doit pas donner plus de 3 % de résidu).

ELÉMENTS.

La composition moyenne des protéides végétaux étant :

(1) KREIDLER et SMALL. A method of standardizing colloidal gold sols by utilizing a standard solution of globulin. *The Journ. of Labor and Clin. Medic.*, 1931, 3, p. 269 à 271.

C	53,0 à 54,3 %
H	6,8 à 7,2 %
O	21,2 à 23,5 %
N	15,6 à 17,6 %
S	0,9 à 1,5 %

nous avons trouvé, pour l'Edestine :

C	53,6 %
H	7,1 %
O	22,0 %
N	16,96 %
S	0,87 %

C'est à la présence de ce soufre, dont 1 atome est uni à plusieurs centaines d'atomes de carbone et d'hydrogène, que l'on attribue d'ordinaire la complexité de la formule de la molécule protéidique.

Produits d'hydrolyse.

Avec la *pepsine*, l'édestine ne donne pas d'acides-aminés, d'après les recherches remarquables de WALDSCHMIDT-LEITZ; mais seulement des produits plus complexes du dédoublement de sa molécule.

Par contre, avec la *trypsine* ou par une hydrolyse *acide*, on obtient, pour 100 grs d'édestine :

3,8 de Glycocolle.
3,6 d'Alanine.
6,2 de Valine.
14,5 de Leucine.
4,5 d'Acide aspartique.
14,5 d'Acide glutamique.
3,9 de Lysine.
0,33 de Sérine.

1,7	de Proline.
2,0	d'Oxyproline.
15,8	d'Arginine.
4,0	d'Histidine.
0,25	de Cystine.
2,3	d'Ammoniaque.
Total : 77,38 %	

Il convient de n'accepter ces chiffres qu'avec une prudente réserve. Ils diffèrent parfois assez sensiblement d'un auteur à l'autre. Ainsi Pierre THOMAS¹ donne les suivants :

5	de Glycine.
4	d'Alanine.
1	de Valine.
15	de Leucine.
3	d'Acide aspartique.
9	d'Acide glutamique.
1	de Lysine.
1	de Sérine.
1	de Proline.
1	d'Oxyproline.
8	d'Arginine.
1	d'Histidine.
1	de Cystine.
1	de Phénylalanine.
1	de Tyrosine.
1	de Tryptophane.
Total : 54 %.	

D'après ABDERHALDEN², l'édestine renferme aussi de l'acide amino-valérianique.

(1) Pierre THOMAS. Manuel de Biochimie, Paris, 1936.

(2) ABDERHALDEN. Hydrolyse des Edestins. *Zeit. f. physiolog. Chem.*, Strasburg, 1903, XL, 499-506.

Il reste, on le voit, encore beaucoup à faire dans l'étude de sa constitution.

L'identification des produits d'hydrolyse des protéides sert à la détermination de leur poids moléculaire. C'est ainsi que Pierre THOMAS¹ assure que « la molécule d'édestine serait formée de 54 molécules, comprenant au moins 16 acides aminés différents,² et pesant ensemble (sans déduction des molécules d'eau éliminées par les soudures) : 7.639, chiffre encore différent de ceux proposés page 76.

Le problème est donc très important et reste posé : il fait à l'heure actuelle, l'objet de nombreuses recherches, en particulier à l'Université de Genève.

Il a paru intéressant à ABDERHALDEN et ROSTOSKI³ de comparer les *produits d'hydrolyse* de l'édestine, obtenus d'une part avec du suc gastrique de chien, additionné de HCl (0,4 %) et d'autre part, avec HCl à chaud. Ces auteurs ont constaté que, tandis que l'hydrolyse acide délivre la plupart des produits que nous venons d'énumérer, l'hydrolyse gastrique ne donne aucun des acides en question, sauf toutefois des traces de tyrosine. Donc, la digestion ne dépasse pas le stade « peptone ». Nous le vérifierons au Chapitre VII.

(1) Pierre THOMAS. *Loc. cit.*

(2) Voir ci-dessus.

(3) ABDERHALDEN et ROSTOSKI. Die monoaminosäuren des Edes-tins aus Baumwdsamen und deren Verhalten gegen magensaft
Zeit. f. physiolog. Chem., Strasburg, 1905, XLIV, 265-276.

Caractères particuliers des Solutions d'Edestine.

Solutions chlorhydriques. L'édestine peut y être précipitée par addition d'une solution de chlorure de sodium ou de sulfate de magnésium à saturation.

Une semblable précipitation est obtenue par addition d'acide nitrique concentré ou d'une solution d'acétate de sodium.

Une série d'essais nous a permis d'établir les points suivants :

1) 8 cc. d'une solution obtenue avec :

Solution d'Edestine¹. 1 cc. (soit 0,005 d'édestine)

Eau distillée 20 cc.

additionnés de 0 cc. 5 d'une solution d'acétate de sodium donne un *louche net*.

2) 8 cc. d'une solution obtenue avec :

Solution précédente 1 cc. (soit 0,00025 d'édestine)

Eau distillée 20 cc.

additionnés de 0 cc. 5 d'une solution d'acétate de sodium, donne une *opalescence*.

3) Avec des dilutions supérieures : aucune opalescence.

Nous pouvons donc dire que la sensibilité de l'édestine, en solution chlorhydrique, à l'acétate de sodium est de 2 pour 10.000

et, par conséquent, que ce dernier constitue le réactif de choix de l'édestine.

(1) Voir page 114 : (Solution E).

Nous proposons le réactif suivant :

Acétate de sodium	21 gr. 3
Eau distillée	100 cc.

Par simple mélange, la dissolution est rapide, à froid et le réactif se conserve sans altération.

(L'acétate de sodium est le sel cristallisé : $\text{CH}_3\text{-COONa} + 3 \text{ H}_2 \text{ O}$, Poids moléculaire : 136,07 correspondant à 60,3 % de sel anhydre.)

Nous utiliserons ces notions intéressantes et en particulier ce réactif, pour le titrage de la pepsine.

Solutions salines. L'édestine peut y être précipitée par addition d'acide chlorhydrique.

L'eau distillée en excès, donnerait un résultat analogue.

Enfin, les unes et les autres (solutions chlorhydrique et saline) précipitent avec la plupart des réactifs généraux des albuminoïdes :

Acide picrique : précipité très abondant.

— trichloracétique	—
— phosphotungstique	—
— phosphomolybdique	—
— sulfosalicylique	—

Avec ces réactifs, les précipités obtenus sont des *sels* : l'édestine se comporte avec eux comme une base. Il est vraisemblable qu'une partie de l'azote qu'elle renferme est de l'azote imidé.

Elle donne un précipité blanchâtre avec le réactif de Tanret et un précipité plus ou moins abondant avec la solution de sulfate d'ammonium en excès, avec le tanin et avec les réactifs alcaloïdiques en général.

Caractère amphotère. De par ses constituants, l'édestine possède une fonction acide et une fonction basique. C'est là l'explication des solubilités contradictoires exposées plus haut. C'est aussi celle du point iso-électrique fixe que nous lui avons attribué.

c) *Physico-chimiques.* La propriété physico-chimique principale de l'édestine est l'état *colloïdal* de ses solutions.

Pratiquement, cette propriété se traduit par deux phénomènes :

Elle *flocule* sous l'influence de certains réactifs (sels neutres en solution saturée).

Elle *coagule* par d'autres (hydrates de métaux lourds) ou par la chaleur.

Quatre réactions colorées (dont deux sont d'ailleurs communes à tous les protéides) la caractérisent :

La réaction du biuret.

— xanthoprotéique.

— de Millon.

— glyoxylique.

La première (couleur violette en présence de sulfate de cuivre à 2 % en milieu alcalin) est due à des groupements d'atomes susceptibles de donner naissance à des corps du type du biuret :



La 2^e (coloration jaune, en présence de NO^3H , virant à l'orangé avec NH^3) est due à la nitration des cycles aromatiques de la tyrosine ou de la phényla-

lanine. L'ammoniaque transforme ensuite ces dérivés nitrés en sels plus fortement colorés.

La 3^e (coloration rose avec le Réactif de Millon : nitrate acide de mercure) est due au groupement phénol de la tyrosine.

La 4^e enfin (coloration violette en présence d'acide glyoxylique, en milieu sulfurique) est due au tryptophane.

d) *Biologiques*. Comme tous les protéides, l'édésine a pour propriété principale d'être disloquée par les ferments protéolytiques.

Avec la pepsine, en particulier, elle donne d'abord une albumose, l'édestose; puis une peptone, l'édésine-peptone.

L'hydrolyse s'arrête là.

L'étude de ce phénomène important mérite un chapitre spécial, qui sera le suivant.

CHAPITRE V

HYDROLYSE DE L'EDESTINE PAR LA PEPSINE

Nous avons vu, au Chapitre IV, que l'édestine est un protéide cristallisé, facile à obtenir, d'un prix de revient peu élevé (matières premières : chanvre et sel marin, peu coûteux), de bonne conservation et que, sur ces divers points, elle répond en somme à nos desideratas de la page 61.

Il nous reste à vérifier si elle est *facilement clivable* par la pepsine et dans quelles conditions.

Si nous arrivons à le démontrer, nous pourrions proposer cette globuline comme matière passive d'un essai uniforme des pepsines commerciales.

I) Un premier problème se pose : Si nous mettons en contact pepsine et édestine, *dans quel rapport* devons-nous utiliser enzyme et protéide pour réaliser l'hydrolyse ?

Pour établir ce rapport, il a fallu évidemment que nous tenions compte des observations qui vont suivre, relativement à l'acidité de la solution nécessaire, la température de digestion, la durée de cette dernière, etc.

Nous admettrons donc dès maintenant que nous faisons une protéolyse d'une heure, à 50° en milieu chlorhydrique, et à un pH de 2, à 2,2, avec touche azotique : toutes conditions indispensables, ainsi que nous l'établirons, pour obtenir une digestion *optimum*.

Nous avons effectué de nombreux essais, en opérant toujours ainsi qu'il vient d'être décrit, mais en faisant *varier à chaque fois* la quantité d'édestine, en présence de la dose de pepsine, toujours *uniforme*.

La lecture du Tableau I rendra mieux compte qu'une longue description, de nos différents résultats.

TABLEAU I.

Pepsine	Edestine	Touche azotique ¹
0,10	0,50	—
0,10	0,60	—
0,10	0,75	—
0,10	0,90	—
0,10	0,95	—
0,10	1,00	—
0,10	1,06	+ (louche très léger)
0,10	1,10	+ (louche net)
0,10	1,20	+
0,10	1,50	+ (précipité)
0,10	2,00	+ (précipité)

Pour le résumer, nous dirons que dix centigrammes de pepsine française, titre 100 :

Hydrolysent entièrement : 0,50; 0,60; 0,75; 0,90; 0,95; 1,00 d'édestine.

Peptonisent plus difficilement : 1,06 d'édestine.

(1) Le signe + signifie touche azotique positive; le signe — touche azotique négative.

Ne digèrent pas entièrement : 1,10; 1,20; à plus forte raison, 1,50 et 2,00 d'édestine.

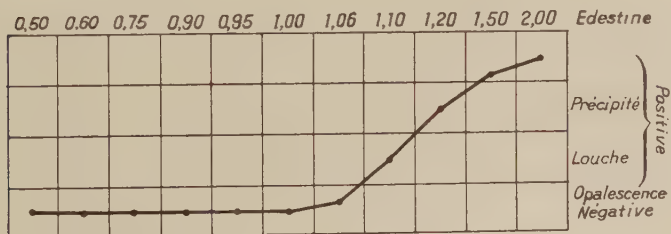
(La touche azotique, faible à 1,06, est nettement positive à partir de 1,10).

Complétons ce Tableau I, par un Tableau II, dans lequel 0,05 de pepsine française titre 100 digèrent entièrement 0,30; 0,33; 0,36; 0,40; 0,45; 0,48; 0,50 d'édestine; mais ne peptonisent plus 0,52; 0,60 et 0,65 d'édestine.

TABLEAU II.

Pepsine	Edestine	Touche azotique
0,05	0,30	—
0,05	0,33	—
0,05	0,36	—
0,05	0,40	—
0,05	0,45	—
0,05	0,48	—
0,05	0,50	—
0,05	0,52	+ (louche)
0,05	0,60	+ (précipité)
0,05	0,65	+ (précipité)

Nous pourrions schématiser les résultats concordants de ces deux tableaux I et II, par le *graphique A* suivant :



Nous concluons de ces Tableaux I et II et du graphique A les schématisant que « 0,10 de pepsine française titre 100, sont capables de digérer, en une heure et dans les conditions ci-dessus : 1 gramme d'édestine et pas davantage ».

Utilisation de ce rapport pour l'essai à l'édestine de pepsines étrangères.

Dans les conditions des essais précédents, une pepsine allemande, une pepsine suisse Ph V et une pepsine anglaise en paillettes titre 2.500, nous ont donné une touche azotique négative. Il s'agissait, dans les 2 premiers cas, de 0,10 de pepsine et de 1,00 d'édestine; dans le 3^e cas, de 0,06 de pepsine et de 1,00 d'édestine.

Nous en avons conclu que ces 3 échantillons titraient au *minimum 100* au sens français.

Et en effet, la pepsine allemande titre officiellement 100; la pepsine suisse : 500 et la pepsine anglaise correspond au titre français de 170.

II) Ce rapport étant fixé, nous avons voulu définir la *température optimum* de la protéolyse.

Dans ce but, plusieurs essais ont été faits à des températures *différentes* : chaque titrage étant effectué avec 0,10 de pepsine titre 100 et 1 gr. d'édestine, en solution chlorhydrique à pH : 1,82 et pendant 1 heure exactement.

Le tableau III en consigne les résultats.

TABLEAU III.

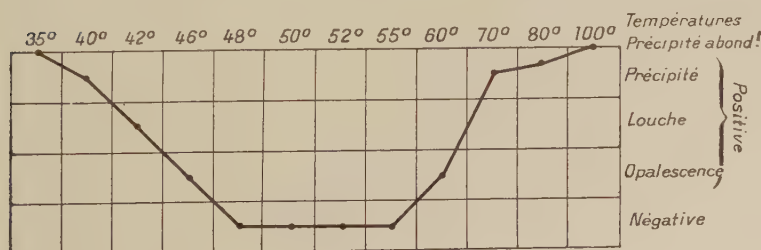
Température	Touche azotique
35°	+ (précipité)
40°	+ (trouble)
42°	+ (léger)
46°	+ (léger)
48°	—
50°	—
52°	—
55°	—
60°	+ (léger)
70°	+ (précipité)
80°	+ (précipité)
100°	+ (précipité)

A 35°, la touche azotique a été positive, avec un précipité. A 40°, positive également, avec un trouble; à 42°, positive, avec un louche, ainsi qu'à 46°.

Mais à partir de 48° jusqu'à 55° inclus, la touche azotique a été négative.

Elle est redevenue positive à partir de 60°, avec un léger louche. A 70°, précipité; à 80° et 100° : précipités abondants. Ces trois derniers faits n'ont pas lieu de nous surprendre : le pouvoir protéolytique de la pepsine étant théoriquement détruit à ces diverses températures.

Le graphique B exprime ces résultats.



Il faut conclure de l'examen du tableau III et du graphique B que la température optimum de digestion de l'édestine par la pepsine est comprise entre 48° et 55°, soit en terme moyen, 50°.

III) Nous étudierons en troisième lieu, la question de la *durée* optimum de la protéolyse édestinique.

Les essais qui ont servi à l'établir ont tous été effectués avec :

0,10 de pepsine titre 100 et 1 gr d'édestine en solution chlorhydrique à pH : 1,8-2 et à la température de 50°

TABLEAU IV.

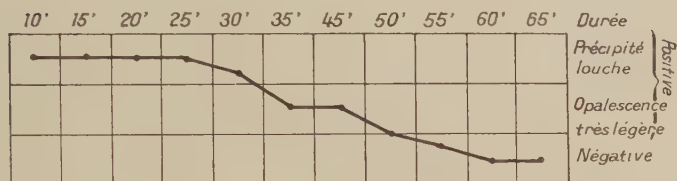
Durée	Touche azotique
10'	+
15'	+
20'	+
25'	+
30'	+
35'	+
45'	+
50'	+
55'	+ (louche léger)
60'	—
65'	—
	etc.

Le tableau IV montre qu'après 10', la touche azotique est toujours positive et qu'il en est de même après 15', 20', 25', 30', 35', 45', et 50'.

Après 55', elle est positive encore, mais plus légère.

Après 60', 65' et au-delà, elle est franchement négative.

Le graphique C schématise ces résultats.



L'examen du Tableau IV et du graphique C, qui lui correspond, indique que la *durée optimum* de la protéolyse de 1 gr. d'édestine par 0,10 de pepsine titre 100, en milieu chlorhydrique, à 50°, est de 60 minutes.

Avant de terminer cette étude de la durée protéolytique, notons les essais que nous avons faits en présence d'*acide lactique*, lequel, on s'en souvient, était utilisé en 1866.

Les tableaux V et VI montrent que, dans ces conditions, 0,10 de pepsine titre 100 ne digèrent pas 1 gr. d'édestine en 1 heure, mais qu'il leur faut 90' pour achever le clivage.

Et si l'on fait agir 0,10 de pepsine titre 100 sur 2 gr. d'édestine, on constate qu'après une demi-heure et une heure, tout n'est pas digéré; mais que 2 heures sont nécessaires pour arriver à ce résultat

TABLEAU V.

(Acide lactique : 1 gr. 20).			
Pepsine	Edestine	Durée	Touche azotique
0,10	1,00	60'	+
0,10	1,00	90'	—
0,10	1,00	120'	—

TABLEAU VI.

(Acide lactique : 1 gr. 20).			
Pepsine	Edestine	Durée	Touche azotique
0,10	2 gr.	30'	+
0,10	2 gr.	60'	+
0,10	2 gr.	90'	+
0,10	2 gr.	120'	—

Ces expériences complémentaires prouvent, comme nous l'avons assuré déjà, que l'acide de *choix* pour l'hydrolyse fermentaire de l'édestine est l'acide chlorhydrique, et non l'acide lactique.

IV) La question du *pH optimum* a été ensuite examinée.

Considérant d'une part que la protéolyse s'effectue le mieux en milieu chlorhydrique à 3 pour 1.000 et d'autre part, que le pH optimum de l'hydrolyse pepsique est 1,5-2, nous avons fait une première série d'essais en augmentant la quantité théorique d'acide chlorhydrique et une seconde série en la diminuant.

Pour les uns et les autres, nous avons mis en pré-

sence 0,10 de pepsine titre 100 et 1 gr. d'édestine, pendant 1 heure, à 50°, avec 100 cc. d'eau acidulée d'une façon variable, avec l'acide chlorhydrique dilué du Codex.

Le tableau VII indique qu'avec 1 gr. 25; 1 gr. 50; 2 gr. d'acide, dans des conditions identiques, la protéolyse est incomplète.

Elle est presque complète avec 2 gr. 25 et elle est totale avec 2 gr. 40; 2 gr. 60; 2 gr. 90; 3 gr.; 3 gr. 15.

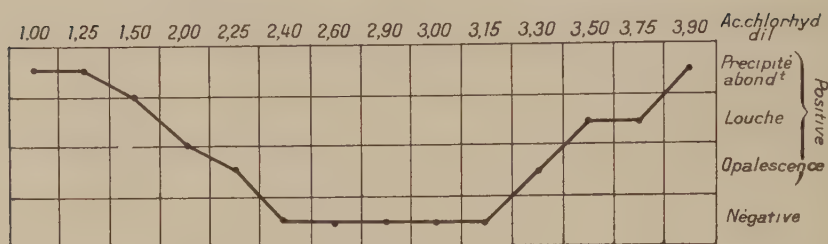
Avec 3 gr. 30, la digestion est moins bonne.

Avec 3 gr. 50; 3 gr. 75; 3 gr. 90 et au delà, la pepsine, en milieu trop acide, ne digère plus parfaitement.

TABLEAU VII.

Acide chlorhydrique dilué.	Touche azotique
1,00	+
1,25	+
1,50	+
2,00	+
2,25	+ (légèrement)
2,40	—
2,60	—
2,90	—
3,00	—
3,15	—
3,30	+ (légèrement)
3,50	+
3,75	+
3,90	+ (précipité)

Le graphique D reproduit ces expériences.



Il résulte de l'observation du Tableau VII et du graphique D, que la quantité optimum d'acide chlorhydrique dilué à employer est comprise entre 2 gr. 40 et 3 gr. 15, soit, en moyenne, 3 gr.

V) Passons maintenant rapidement en revue la question de la quantité d'eau distillée à employer, qui est la moins importante de toutes celles que nous devons examiner et sur laquelle, nous l'avons vu, presque tout le monde est d'accord.

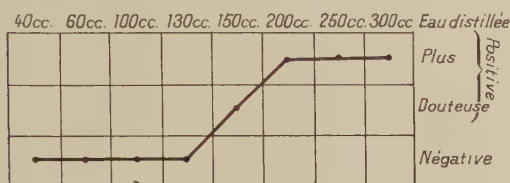
Nous voyons, au tableau VIII, que 0,10 de pepsine titre 100 et 1 gr. d'édestine, en milieu chlorhydrique, à 50°, pendant une heure, donnent une touche azotique négative (donc protéolyse convenable) avec 40 cc.; 60 cc.; 100 cc.; 130 cc. d'eau distillée.

TABLEAU VIII.

Eau distillée	Touche azotique
40 cc.	—
60 cc.	—
100 cc.	—
130 cc.	—
150 cc.	— (douteuse)
200 cc.	+ (légèrement)

La touche azotique est un peu moins nette avec 150 cc. et elle est positive (très légèrement) avec 200 cc.

Le graphique E mentionne ces résultats.



Il ressort de ces essais que la quantité d'eau à utiliser est 100 cc.¹.

VI) Terminons ces essais relatifs à la protéolyse de l'édestine, par l'examen du *réactif* servant à caractériser la fin de la digestion.

Imitant le Codex français, nous avons d'abord choisi l'acide nitrique, qui (nous l'avons signalé) présente le double avantage de précipiter l'édestine non digérée et de ne pas précipiter les peptones : double avantage qu'on ne retrouve pas chez tous les réactifs généraux des protéides.

Comme au Codex, XX gouttes d'acide nitrique, dans nos essais, ne doivent donner ni louche, ni précipité, à la température de 17-19°.

Le réactif à l'acétate de sodium², en nous donnant des résultats analogues, nous a semblé moins brutal que NO³H.

(1) Toutefois, cette quantité peut être portée sans inconvénient à 200 cc. ou 300 cc., si l'on opère sur des doses minimales de ferment et de protéide.

(2) Voir page 83.

CHAPITRE VI

VITESSE DE CLIVAGE DE L'ÉDESTINE

Nous avons essayé dans le chapitre précédent, de préciser les conditions optima de la protéolyse de l'édestine. Nous l'avons fait en examinant séparément chacun des éléments du titrage : Quantité de protéide, Acidité, Température, Durée, Quantité d'eau, Réaction finale, etc., c'est-à-dire les éléments même que nous avons exposés et critiqués dans chaque pharmacopée, au Chapitre III.

Ces conditions, étant bien établies, il peut être curieux d'examiner l'attitude de l'édestine en présence du ferment et de voir, en fait, comme elle se trouve disloquée, scindée dans sa molécule. Nous étudierons donc le *clivage de l'édestine*.

Tout se passe-t-il comme dans la scission protéolytique théorique, avec formation successive de :

Syntonines.

Albumoses.

Peptones.

Acides-aminés.

Nous avons déjà répondu par avance à cette question, dans notre premier chapitre : « Il ne peut en être ainsi avec la pepsine ».

Si, en effet, l'hydrolyse *acide* des protéides en général, et de l'édestine en particulier, conduit toujours et régulièrement à un certain nombre de constituants qui sont, pour la plupart, des acides-aminés de formule générale : $R-CH(NH^2)-COOH$, il n'en est jamais ainsi dans l'hydrolyse *fermentaire* due à la pepsine.

Le rapport numérique des groupements NH^2 et $COOH$ ne reste pas constant : on trouve généralement, en fin d'opération, un excès de carboxyles (WALDSCHMIDT-LEITZ, et SIMON), mais là s'arrête la dégradation.

Il eut été intéressant de vérifier si tous les produits d'hydrolyse de l'édestine sont les mêmes, que ce soit par voie artificielle ou par voie naturelle, c'est-à-dire par l'intermédiaire d'un acide ou par l'entremise d'un ferment.

Car la question présente plus d'intérêt qu'on ne pense tout d'abord.

On se souvient, en effet, qu'en décrivant les propriétés physiques de l'édestine, il nous a été impossible de lui attribuer un *poids moléculaire* exact; les auteurs différant, à ce sujet dans d'énormes proportions.

C'est que, pour l'édestine comme pour tous les protéides, parmi les innombrables essais tentés pour déterminer leur constitution, la meilleure méthode est

actuellement la décomposition de leurs grosses molécules en groupes moins compliqués.

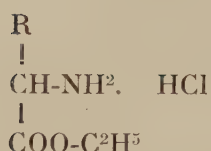
Car pour ces corps si importants (il ne s'agit de rien moins que de la *matière vivante* elle-même) dont on ne connaît ni point de fusion, ni forme cristalline caractéristique, ni poids moléculaire exact, seule la désagrégation de la molécule en groupes atomiques d'abord assez grands (albumoses, peptones) qu'une hydrolyse plus profonde peut scinder en molécules plus simples encore donne quelques indications. Les acides y parviennent : *la pepsine ne le peut pas*.

En milieu acide, les produits finaux de l'hydrolyse sont des corps cristallisés, amphotériques eux aussi et possédant des propriétés physiques et chimiques déterminées. Ce sont les acides aminés.

La séparation de ces divers acides aminés offre de grandes difficultés. Beaucoup de savants s'y sont heurtés. FISCHER et ses élèves, en faisant faire à la question un progrès considérable, ont ouvert une voie nouvelle à l'analyse des protéides. Il nous est impossible de ne pas en dire quelques mots : l'hydrolyse acide étant au fond intimement liée à l'hydrolyse fermentaire.

On chauffe le protéide avec HCl concentré pendant 6 à 10 heures. On chasse dans le vide l'excès d'acide et on concentre à consistance sirupeuse. On ajoute ensuite de l'alcool et on introduit du gaz chlorhydrique sec, jusqu'à saturation.

Il se forme ainsi les chlorhydrates des esters éthyliques des acides aminés, de formule générale :



On distille l'alcool et on libère les esters par traitement avec la soude caustique.

On les reprend par l'éther.

En distillant les esters sous pression réduite, on obtient 4 fractions, dont chacune ne contient qu'un nombre limité d'acides-aminés.

Chaque fraction est saponifiée et analysée et ses constituants peuvent être séparés par cristallisation fractionnée.

Par cette méthode, FISCHER a obtenu, pour l'édestine : 50,2 % en poids de la matière primitive, d'esters distillés.

Ce résultat n'est pas suffisant pour acquérir, sur l'édestine et sa constitution, des notions plus approfondies que celles que nous possédons; mais c'est un acheminement vers une connaissance complète plus ou moins éloignée.

Nous n'en sommes pas là avec l'hydrolyse fermentaire et, pour les raisons déjà expliquées, nous ne pourrions jamais y arriver.

Limitant nos connaissances à la caractérisation des peptones, qui sont très probablement le stade que ne dépasse pas la protéolyse pepsinique (tous les produits formés par l'action de la pepsine sur l'édestine possédant encore la plupart des réactions colorées de l'édestine elle-même : biuret, xanthoprotéique, etc.), nous avons dû borner nos recherches à l'examen de la *vitesse du clivage de ce protéide*.

Quatre séries d'expériences, dans des conditions analogues, soit 0,10 de ferment et 0,50 ou 1 gr. d'édestine, en solution chlorhydrique et à 50°, nous ont donné quelques observations intéressantes :

Première expérience. 0,10 de ferment et 0,50 de protéide après une digestion de 5', ne donnent pas de précipité avec 20 gouttes d'acide azotique.

On en déduit que 0,50 d'édestine sont digérés pendant ce temps.

Deuxième expérience. 0,10 de ferment et 1 gr. de protéide après une digestion de 5', précipitent avec 20 gouttes d'acide azotique.

On en déduit que, si 0,50 d'édestine sont digérés pendant ce temps¹, les 0,50 restant sont peu ou pas attaqués.

Troisième expérience. 0,10 de ferment et 1 gr. de protéide donnent, suivant la durée de la digestion, une touche azotique positive, avec un nombre différent de gouttes d'acide azotique.

TABLEAU X.

Durée de la digestion.	Touche azotique <i>positive</i> avec :
5'	6 gouttes de NO ³ H
10'	8 gouttes —
15'	8 gouttes —
20'	9 gouttes —
25'	10 gouttes —
30'	10 gouttes —
35'	11 gouttes —
40'	11 gouttes —
45'	12 gouttes —
50'	14 gouttes —
55'	19 gouttes —
60'	Pas de précipité.

(1) Voir ci-dessus.

On en déduit qu'au début, les 6 gouttes d'acide sont probablement nécessaires pour précipiter les 0,50 d'édestine attaqués au bout de 5'; qu'après 10', il y a moins de 0,50 d'édestine intacte et qu'il faut davantage de gouttes d'acide azotique (8) pour la précipiter et ainsi de suite.

Quatrième expérience. Avec 20 gouttes d'acide azotique, on a : un précipité permanent entre 5' et 45',
un précipité beaucoup moins abondant entre 45' et 50',
un louche entre 55' et 60'.

On en déduit qu'à partir de la 45^e minute, les 0,50 d'édestine non touchés au bout de 5'¹, sont en partie détruits et qu'il n'en reste qu'une petite quantité, qui sera clivée dans le dernier quart d'heure.

Ces expériences semblent démontrer que, dans la protéolyse telle que nous l'avons toujours étudiée jusqu'ici, soit 0,10 de ferment pour 1 gr. de protéide, une première tranche de ce dernier (la moitié au moins) se trouve disloquée extrêmement vite, l'autre partie demandant un temps plus considérable pour être scindée. Il convient de retenir à ce sujet que la vitesse de réaction augmente très rapidement avec la température : une élévation de 10° peut la rendre 7 fois plus grande.

Nous avons complété les 4 expériences précédentes par un essai encore plus rapide :

Avec les proportions ferment-protéide indiquées.

(1) Voir 2^e expérience.

ci-dessus, nous avons fait 3 touches azotiques après 2'; après 4' et après 6'.

Dans le 1^{er} Cas, 10 gouttes ont donné un louche très net.

Dans le 2^e Cas, un louche s'est manifesté à la 16^e goutte.

Dans le 3^e Cas, il a fallu aller jusqu'à 22 gouttes pour obtenir un très léger louche.

Nous avons conclu que, lors du clivage de l'édésine par la pepsine :

Il ne se passe rien les 2 premières minutes; un travail considérable s'effectue entre la 3^e et la 6^e minute et une désagrégation beaucoup plus lente s'opère pendant 55 minutes. Cette observation est conforme avec un travail de VAN ARKEL ¹ qui a démontré gravimétriquement que la plus grande partie de l'action de la pepsine sur l'albumine coagulée s'exerce pendant les 15 premières minutes. « Déjà, après 20', il est possible, dit-il, de porter un jugement sur l'activité de la pepsine essayée. Il serait préférable que la pharmacopée indique qu'après une demi-heure, plus de la moitié de l'albumine doit être dissoute ».

Ce phénomène, confirmé d'ailleurs par d'autres auteurs (STAZIAK et KERENYI) ² peut s'expliquer, à notre avis :

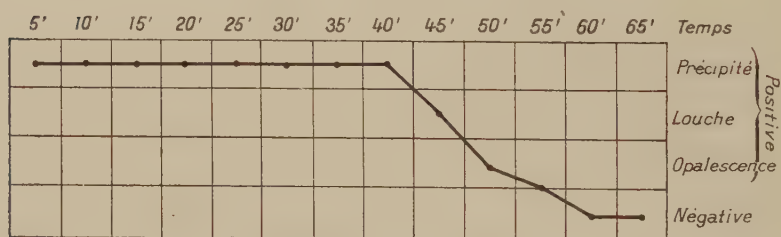
1) Par suite de la diminution de la surface d'attaque du protéide.

(1) VAN ARKEL. Untersuchungen über die Wirkung des Pepsins. *Pharm. Weekbl.*, 1931, 68, n° 28, p. 657, d'après *Pharm. Zentralhalle*, 1931, 72, p. 711.

(2) *Loc. cit.*

2) Par suite de la production dans la liqueur de dérivés à action retardatrice et de l'accumulation dans la molécule protéique de composants plus ou moins résistants.

En examinant le *graphique F* ci-dessous, et en retenant les observations ci-dessus, on remarquera qu'on est en conformité, au moins apparente, avec la vieille règle de SCHUTZ, suivant laquelle « la quantité de protéide transformée est proportionnelle à la racine carrée de la quantité de ferment mis en œuvre du moins dans les premiers moments de la digestion ».



Essai de la méthode de Sorensen.

Pour clore cette difficile question du clivage de l'édestine, nous verrons ce qui reste dans la liqueur finale, au terme de la digestion et, en particulier, nous rechercherons malgré tout les acides-aminés, si souvent niés par la majorité des auteurs.

Première observation : Après action de la pepsine sur l'édestine, si on neutralise la liqueur par le carbonate de soude, on obtient un précipité volumineux.

On appelait autrefois un précipité de ce genre, une parapeptone; la peptone proprement dite restant en solution. On sait aujourd'hui que ce précipité est un acidalbumine.

Deuxième observation : On ne constate aucune modification du pouvoir rotatoire et de l'indice de réfraction de la liqueur, en fin de digestion.

Il semble donc bien que la micelle n'a pas été attaquée dans ses liaisons essentielles.

Plusieurs essais à la méthode de SÖRENSEN nous ont confirmé cette hypothèse.

Technique. A la fin de la protéolyse, nous avons prélevé 10 cc. de liqueur digérée. Nous les avons neutralisés *exactement* avec Na OH N/10, en présence de 10 gouttes de phtaléine à 1 %; jusqu'à légère teinte rose.

Nous les avons additionnés de 10 cc. de formol commercial à 40 %, *exactement* neutralisé lui aussi et de la même manière.

Le mélange, devenu acide, s'est décoloré instantanément. Nous avons alors versé Na OH N/10 jusqu'à réapparition de la teinte rose.

Le nombre de cc. versés, multiplié par le poids moléculaire d'un acide aminé connu (on calcule ordinairement en glyocolle) donnant la quantité d'acides aminés de la prise d'essai, les calculs, faciles à faire, ne présentent ici aucun intérêt, en raison des minimes quantités de soude versées.

C'est ainsi que nous avons obtenu les résultats suivants, résumés dans le Tableau XII.

TABLEAU XII.

Pepsine. Titre 100	Edestine	NaOH N/10
0,05	0,50	0 cc. 2
0,10	1,00	0 cc. 35
Pepsine amylacée Titre 40.		
0,10	1,00	0 cc. 25
Pepsine suisse. Titre 500		
0,20	0,50	0 cc. 2
Pepsine anglaise Titre 2,500		
0,06	0,50	0 cc. 25
Pepsine allemande. Titre 100		
0,20	0,50	0 cc. 2

CONCLUSION. Serons-nous autorisé, avec des quantités de soude aussi peu élevées, à parler de production d'acides-aminés dans l'hydrolyse de la pepsine ?

Il ne le semble pas.

Tout au plus peut-on dire qu'en cours de digestion, il s'est produit des doses infinitésimales d'acides-aminés, dûs probablement, ainsi que nous l'avons

expliqué page 19, aux petites quantités de trypsine, contenues dans toutes les pepsines commerciales ¹.

Et, en tous cas, dans de telles conditions, il ne peut être question, en aucune façon, d'utiliser la méthode de SÖRENSEN pour un tirage indirect de l'activité pepsique.

(1) Explication bien fragile, si l'on songe que la trypsine n'agit plus à partir d'un pH de 4 et qu'elle préfère un milieu alcalin, à un pH 6,8-7,3.

TROISIEME. PARTIE

APPLICATIONS

CHAPITRE VII

PROCEDE DE TITRAGE DE LA PEPSINE AU MOYEN DE L'ÉDESTINE

Après avoir, au cours des chapitres précédents, critiqué les différents essais de la pepsine dans les principales pharmacopées, nous avons étudié l'édestine et la possibilité de son application au titrage de la pepsine dans des conditions telles, que nous sommes tout naturellement amené à l'utiliser comme *protéide* dans une méthode de titrage que nous devons maintenant décrire en détail.

L'idée du titrage de la pepsine au moyen de l'édestine n'est d'ailleurs pas nouvelle. Résumons en particulier les trois méthodes suivantes ¹ :

1) *Méthode de Fuld* (1907).

Principe : 3 solutions.

Une d'édestine.

(1) V. page 9.

Une de pepsine chlorhydrique.

Une de chlorure de sodium.

Mettre dans 10 petits tubes à hémolyse, une dose fixe de solution d'édestine.

Ajouter à chacun, une dose croissante de solution de pepsine.

Noter les troubles produits, qui sont forcément différents. Le tube dans lequel le trouble n'est plus apparent est celui où la pepsine répond à l'essai fixé.

On opère comparativement avec une pepsine de titre connu.

Cette méthode est surtout utilisée pour le suc gastrique.

2) *Méthode de Delaunay et Bailly* (1915).

Faire d'abord digérer l'édestine; vérifier avec la touche azotique et comparer avec une goutte de lait versée dans un tube d'eau distillée de dimensions semblables.

3) *Méthode de Plé* (1929).

C'est une modification de celle de FULD.

Après digestion, mesurer le degré d'opacité des tubes, par comparaison avec une pepsine standard essayée en même temps.

Le procédé que nous proposons est le suivant :

Principe. L'acétate de sodium précipite l'édestine en solution acide, cependant que les produits de digestion de l'édestine par la pepsine restent en solution. Cette réaction est due à l'acide acétique mis en liberté par l'acide chlorhydrique.

Produits nécessaires.

0,50 d'édestine.

0,10 de pepsine.

HCl N/

250 cc. Eau distillée.

Réactif à l'acétate de sodium¹.

Matériel nécessaire.

Un Bécher de 16 cm. de hauteur sur 7 cm. de diamètre.

10 grandes éprouvettes, bouchées à l'émeri si possible.

2 ballons jaugés de 100 cc.

1 Bunsen.

1 Thermomètre.

On voit que les produits nécessaires et le matériel indispensable ne sont pas bien considérables. Le procédé, pour ces 2 raisons, ne sera donc ni coûteux, ni inabordable parce que trop compliqué.

Technique.

Séchage.

Nous conseillerons, avant tout, de dessécher la pepsine sur le vide sulfurique, à poids constant. Ainsi que nous l'avons vu page 15, cet enzyme est un produit hygroscopique et aucune pharmacopée ne tient compte de cette erreur initiale, si minime soit-elle.

(1) Voir préparation, page 83.

Précisons cependant que cette précaution n'est indispensable que pour un titrage très rigoureux; qu'elle n'a sa place que dans un laboratoire bien installé et que nous ne l'exigeons pas absolument dans le laboratoire plus modeste de l'officine moyenne.

Solutions.

On prépare ensuite deux solutions : E et P.

La solution E sera une solution du protéide; la solution P sera une solution du ferment. Les 2 sont à un pH différent, calculé de telle sorte que leur mélange donne un pH de 1,8 à 2.

Les avantages de ces 2 solutions sont les suivants :

Possibilité de répéter l'opération sans pesées nouvelles.

Meilleures dissolutions des 2 produits.

Répartition plus rigoureuse des quantités.

Enfin, facilité de faire des solutions comparatives nécessaires.

Les proportions des 2 solutions sont les suivantes :

E)	P)
Edestine 0 gr. 50	Pepsine 0 gr. 10
HCl N/ 9 cc. 5	HCl N/ 4 cc.
Eau dist. q. s. p. 100 cc.	Eau dist. q. s. p. 100 cc.

Le pH de la solution E est de 1,6 et un cc. = 0,005 d'édestine.

Le pH de la solution P est de 2,0 et un cc. = 0,001 de pepsine.

Préparation.

Solution E. Dans un ballon jaugé de 100, on mesure 9 cc. 5 d'HCl N. + 80 cc. d'eau distillée et on porte dans le bain-marie à 40°. Quand cette température est atteinte, on introduit par petites portions l'édestine, en agitant légèrement à chaque fois et on complète avec de l'eau distillée, à 100 cc. exactement. On chauffe à 44-45°, jusqu'à complète dissolution.

Eviter la mousse, qui générerait la dissolution et ne pas dépasser la température prescrite, pour ne pas courir le risque d'hydrolyse partielle. Il ne doit pas se produire de coloration violette; mais seulement une teinte faiblement jaune. L'addition d'eau donne d'abord une solution légèrement laiteuse, mais celle-ci ne tarde pas à devenir limpide.

En cas de prise en masse de la quantité d'édestine versée trop rapidement ou d'un seul coup, agiter longtemps. La dissolution se fera même sans agitation, à la longue si l'on n'est pas trop pressé.

Ne pas se servir de mortier, qui donnerait avec le pilon une masse gluante très gênante¹.

Solution P. Dans un ballon jaugé de 100 cc., mesurer 4 cc. d'HCl N/ et 80 cc. d'eau distillée. Introduire 0,10 de pepsine; agiter et compléter à 100 cc. exactement. La dissolution est immédiate.

La solution P ne se conserve pas.

(1) On peut aussi, si l'on préfère, délayer l'édestine dans 25 cc. d'eau distillée et porter à 45°, au b. m. On additionne de 9 cc. 5 d'HCl N, instantanément la solution trouble s'éclaircit et on complète exactement à 100 cc.

On recommande de ne pas filtrer. La pepsine est, en effet, adsorbée par le papier-filtre, ce phénomène se manifestant beaucoup plus rapidement à 40° qu'à 30° et plus complètement avec une solution à 1/1.000 qu'avec une solution à 1/300¹.

Ces solutions terminées, on effectuera l'hydrolyse de la façon suivante :

Hydrolyse. On fera d'abord une *protéolyse courante*, qui permettra de vérifier, par comparaison avec un témoin, si la pepsine titre ou non le chiffre indiqué par son étiquette.

On fera ensuite une *hydrolyse plus précise* pour déterminer son titre réel et exact (autant qu'on puisse le faire).

Dans beaucoup de cas, la protéolyse courante sera suffisante pour permettre d'accepter ou de refuser une pepsine commerciale.

L'hydrolyse plus précise, basée sur des comparaisons néphélométriques, s'effectue sur des quantités tellement minimes et fournit par conséquent des louches ou opalescences si rapprochés et peu distincts que l'on ne peut vraiment lui attribuer plus de valeur qu'elle ne mérite. Nous avons fait de nombreux essais, espérant toujours arriver à un résultat précis; mais, avec PLÉ², nous devons reconnaître que : « des différences notables dans les poids de pepsine

(1) Jean EFFRONT. Sur l'absorption de la pepsine par les papiers à filtrer. *C. R. Soc. Biol.*, 1922, 87, p. 1058-1059. Cette constatation semble infirmée par HOLM (Loc. cit.) qui prétend que les solutions de pepsine se laissent filtrer sans perte aussi bien à travers le papier-filtre qu'à travers le coton.

(2) PLÉ. Loc. cit.

à doser n'entraînent que des modifications de louche assez difficiles à apprécier avec exactitude ».

Notre titrage consistera donc surtout en ce que nous appelons la « Protéolyse courante »; nous n'indiquerons les détails d'une « Hydrolyse plus fine » qu'avec les réserves qu'elle impose.

A) *Protéolyse courante.*

Dans une éprouvette bouchée à l'émeri, on mesure à la pipette 8 cc. de solution E, soit 0,04 d'édestine et on porte au bain-marie à 45°. Quant cette température est atteinte, on ajoute 4 cc. de solution P, soit 0,004 de pepsine, mesurés exactement. On mélange les 12 cc. ainsi obtenus, dont le pH est de 2,0-2,1.

On porte la température du bain-marie à 50° et on maintient celle-ci pendant *une heure exactement*.

Ce résultat est facilement atteint avec un simple Bunsen ordinaire et un peu d'attention: le bain-marie étant constitué par un Bécher de dimensions indiquées pages 111.

Au bout d'une heure, on arrête la digestion avec 0 cc. 7 de solution d'acétate de sodium¹.

On place alors la solution digérée, pendant *cinq minutes exactement*, dans un récipient rempli d'eau à la température ordinaire: au bout de 5 minutes, la température du liquide digéré est elle-même de 18-20°.

(1) Si l'on ne dispose pas d'acétate de sodium, utiliser 8 gouttes d'acide nitrique (plus brutal et moins sûr). On peut aussi arrêter l'action fermentaire en mettant l'éprouvette dans un bain d'eau glacée.

Pendant ce refroidissement, on prépare une solution témoin T, avec :

Solution E 3 cc.

HCl N/ 8 cc.

Eau distillée Q. S; p. 100 cc.

Un cc. = 0.00015 d'édestine.

On mesure alors 8 cc. de cette solution T, soit 0,0012 d'édestine dans une éprouvette semblable à celle de la solution digérée. On ajoute 4 cc. d'eau distillée + 0 cc. 7 de réactif à l'acétate de sodium. Il se produira immédiatement une *opalescence*.

Comparaison.

On compare alors la solution digérée et refroidie ou tube D, avec l'éprouvette témoin ou tube T, sur fond noir si possible.

On recommande de placer à côté des tubes D et T, une éprouvette renfermant 12 cc. d'eau distillée pure que nous appellerons tube O. De plus, *la limite du temps de comparaison doit être de 4 minutes exactement*, car à partir de ce moment, les troubles s'accroissent partout, ou même se forment parfois dans les tubes clairs (fait plutôt rare).

On examine donc attentivement sur fond noir les 3 tubes :

Tube O.

Tube D.

Tube T.

On dit que « la pepsine essayée titre 100, si le trouble du tube D est inférieur ou tout au plus

égal à celui du tube T (le tube O restant parfaitement limpide) ».

Ceci est conforme avec les conclusions des chapitres précédents puisque l'opération prouve que 0,004 de pepsine ont digéré entièrement 0,04 d'édestine. On admet une tolérance de 3 % (quantité d'édestine du tube T).

Si, par contre, le trouble du tube D est supérieur à celui du tube T, on dit que la pepsine ne titre pas 100 et doit être rejetée.

B) *Hydrolyse plus fine.*

Nous répétons que le titrage précédent suffit le plus souvent. Et nous devrions borner là notre essai, si, comme tant d'autres et surtout, comme les Allemands, qui ont fait de nombreuses tentatives analogues avec la caséine, nous ne désirions attribuer une valeur quantitative plus ou moins exacte à la pepsine examinée.

On numérote 5 éprouvettes : I, II, III, IV, V.

On mesure exactement, dans chacune d'elles : 6 cc., 7 cc., 8 cc., 9 cc., 10 cc. de solution E. et 4 cc., 3 cc., 2 cc., 1 cc., 0 cc. d'eau distillée. On mélange.

On porte au bain-marie à 45°.

On introduit alors dans chacune d'elles 4 cc. de solution P. Et, comme dans la protéolyse précédente, on maintient le tout, à 50°, au bain-marie, pendant une heure exactement.

On met ainsi en présence, dans le tube I : 0,004 de pepsine et 0,03 d'édestine; dans le tube II : 0,004 de pepsine et 0,035 d'édestine; dans le tube III : 0,004 de

pepsine et 0,04 d'édestine; dans le tube IV : 0,004 de pepsine et 0,045 d'édestine; et dans le tube V : 0,004 de pepsine et 0,05 d'édestine. Et il est facile de penser immédiatement que, d'après l'opération précédente et d'après tous les résultats de ce travail, si la pepsine essayée titre 100, les tubes I, II et III devront être limpides en fin de digestion (après addition d'acétate) et les tubes IV et V, troubles.

De là à imaginer une méthode de dosage précis, il n'y a qu'un pas.

Malheureusement, les choses ne se présentent pas toujours aussi simplement et les différences de troubles ou de louches sont parfois si minimes qu'il est difficile de les distinguer¹.

Au bout d'une heure, on arrête la digestion en mesurant dans chaque éprouvette 0 cc. 7 de solution d'acétate de sodium.

On porte les 5 éprouvettes dans un récipient plein d'eau à la température ordinaire, pendant 5 minutes exactement.

Et on compare sur fond noir, avec un tube O plein d'eau (*sans dépasser le temps limite de 4 minutes exactement*).

Si la pepsine titre 100, les tubes I, II et III sont limpides; les tubes IV et V sont troubles.

Mais d'autres cas peuvent se présenter :

1^{er} Cas. Tous les tubes troubles.

(1) BACHSTÉZ (*loc. cit.*) admet en effet un très faible trouble dans les 1^{res} éprouvettes, mais, dit-il, l'accroissement visible, soudain et fort du trouble, le « saut » entre le N° 4 et le N° 5, par exemple, est tout à fait caractéristique (titrage à la caséine).

2^e Cas. Tous les tubes limpides.

3^e Cas. Tube I, limpide; les autres troubles.

4^e Cas. Tube I et II, limpides; les autres troubles.

5^e Cas. Tubes I, II, III et IV, limpides; le tube V, trouble.

On interprétera ces résultats de la façon suivante.

Interprétation. — On utilisera, pour les calculs, l'équation suivante :

$$\frac{x \times 10}{y}$$

dans laquelle x représente la quantité d'édestine contenue dans le tube examiné; y la quantité de pepsine du même tube; et 10, un coefficient fixe.

1^{er} cas. 0,004 de pepsine ne digèrent même pas 0,03 d'édestine.

$$\frac{0,03 \times 10}{0,004} = 75 \quad \text{La pepsine ne titre pas 75.}$$

2^e cas. 0,04 de pepsine digèrent même 0,05 d'édestine.

$$\frac{0,05 \times 10}{0,004} = 125 \quad \text{La pepsine titre 125 ou plus.}$$

3^e cas. 0,004 de pepsine digèrent 0,03 d'édestine et pas davantage.

$$\frac{0,03 \times 10}{0,004} = 75 \quad \text{La pepsine titre 75.}$$

4^e cas. 0,004 de pepsine digèrent 0,03 et 0,035 d'édestine et pas davantage.

$$\begin{array}{r} 0,035 \times 10 \\ \hline 0,004 \end{array} = 87,5$$

(1) La pepsine titre 87,5.

5^e cas. 0,004 de pepsine digèrent 0,03, 0,035, 0,04 et 0,045 d'édestine.

$$\begin{array}{r} 0,045 \times 10 \\ \hline 0,004 \end{array} = 112,5$$

La pepsine titre 112,5.

Ainsi cette hydrolyse plus fine permet de dire si une pepsine examinée titre :

Moins de 75.
75.
87,5
100
112,5
125 et plus.

Ces résultats plus précis que ceux de la protéolyse courante, connus et enregistrés, on procède à un examen plus serré encore.

Pour cela, on mesure dans une éprouvette 8 cc. 5 de solution E et on refait la technique de la protéolyse totale, avec 4 cc. de solution P.

On compare en fin de digestion avec une éprouvette témoin T', préparée avec :

8 cc. 5 de solution T
4 cc. 5 d'eau distillée
+ 0 cc. 7 de réactif à l'acétate de sodium.

(1) Ici, se placerait le cas déjà cité d'une pepsine titre 100 : tubes I, II et III limpides, soit 0,004 de pepsine qui digèrent 0,03, 0,035 et 0,04 d'édestine.

$$\begin{array}{r} 0,04 \times 10 \\ \hline 0,004 \end{array} = 100$$

Regarder dans les conditions indiquées page 118.

Le trouble de la solution digérée ne devra pas être supérieur à celui du tube témoin T'.

Et dans ce cas, on dira que la pepsine examinée titre entre 100 et 106, (avec une tolérance de 2,4 % : quantité d'édestine du tube T') suivant l'équation :

$$\frac{0,0425 \times 10}{0,004} = 106$$

C'est là vraiment tout ce que l'on peut exiger comme précision.

(Pour les pepsines à titre très élevé, il suffit de diluer la solution P à 10 %, à 20 % et de suivre une technique absolument semblable).

Tel qu'il vient d'être exposé, le titrage proposé donne pour une pepsine commerciale ordinaire une *indication suffisante d'abord* : « Conforme » (c'est-à-dire : titre au moins 100) ou « Pas conforme » ; puis, *par un titrage plus précis*, permet d'affirmer qu'elle titre entre 100 et 106.

Le procédé présente en outre les avantages suivants :

Il est assez rapide (beaucoup plus en tous cas que celui du Codex 1937).

Il est simple et à la portée de tout pharmacien.

Il est bon marché.

On peut lui reprocher, comme à toutes les méthodes néphélométriques, de dépendre en somme d'un sens visuel qui peut varier d'un individu à l'au-

tre et modifier par conséquent les appréciations et les résultats qui en découlent.

C'est en effet là un défaut et il faut reconnaître que l'appréciation des troubles, louches ou opalescences est parfois assez délicate, surtout pour un œil non entraîné.

Nous compléterons donc notre méthode par des exemples de louches ou de troubles faciles à obtenir qui fixeront ce que nous entendons par ces termes. Au cours du titrage, on pourra s'en servir comme solutions comparatives complémentaires.

Nous disons qu'il y a *opalescence* :

1) Quand on mélange une goutte de lait à 15 cc. d'eau distillée.

2) Quand à 5 cc. du mélange suivant :

HCl N/ 1 cc.

Eau distillée 99 cc.

on ajoute : 0 cc. 5 NO³ Ag N/10.

3) Quand à 10 cc. de solution témoin T d'édestine, on ajoute 0 cc. 7 de réactif à l'acétate de sodium.

Par contre, il y a *trouble* :

1) Quand on mélange 4 gouttes de lait à 15 cc. d'eau distillée.

2) Quand à 5 cc. du mélange suivant :

HCl N/100 4 cc.

Eau distillée 96 cc.

on ajoute : 0 cc. 5 NO³ Ag N/10.

3) Quand à 10 cc. de solution E d'édestine, on ajoute 0 cc. 7 de réactif à l'acétate de sodium.

CONCLUSIONS

Nous nous sommes efforcé, dans ce travail :

1) De démontrer les défauts et les désaccords des principales pharmacopées, relativement au titrage de la pepsine.

2) De donner un procédé simple et rapide de fabrication de l'édestine.

3) De déterminer les propriétés de ce protéide et surtout les conditions de son clivage par la pepsine.

4) De proposer un procédé simple et relativement précis de titrage de la pepsine.

Après tant d'autres, nous avons attiré l'attention sur la nécessité d'introduire, dans toutes les pharmacopées, un titre uniforme et standard pour la pepsine.

Ce titre international, complété par un essai international, en dissipant toute confusion contribuerait à rendre à cet excellent médicament la place qu'il mérite dans la thérapeutique moderne.

Le Président de la thèse.

A. GORIS.

VU :

Le Doyen de la Faculté,
PAUL GUERIN.

VU et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,
G. ROUSSY.

BIBLIOGRAPHIE

1. ABDERHALDEN. — Biochemisches Handlexicon. Berlin, 1911-1933.
— Lehrbuch der physiol. Chemie. Berlin, 1931.
2. ARCAD. — Recherche sur le dosage des protides du sérum sanguin et des liquides pathologiques par la méthode à l'acétone de PIETTRE et VILA. *Th. Doct. Ph.* Paris, 1930.
3. ARIEL. — Sur le dosage des produits d'hydrolyse des protides (acides-aminés). *Th. Doct. Sc.*, Genève, 1929.
4. ARTHUS. — Nature des Enzymes. Paris, 1896.
5. ARTHUS. — Chimie physiologique. Masson, 1907.
6. ASTRUC. — Traité de pharmacie galénique. Paris, Maloine, 1928.
7. BAYLISS. — The Nature of Enzyme Action. Londres, 1925.
8. BERTRAND (Gabriel). — Les ferments solubles ou diastases. *Revue scientifique*, 1909.
9. BOSHELL. — Action des rayons ultra-violet sur quelques substances protéiques. *Th. Doct. Méd.*, Lausanne, 1928.
10. BOUCHARA. — Précipitation des protides du lait. *Th. Doct. Ph.*, Paris, 1931.
11. BOUILLAUD. — Etude sur la gélatine et sa précipitation. *Th. doct. ph.*, Toulouse, 1936.
12. BOURQUELOT. — Les Ferments solubles : Diastases-Enzymes. Sté d'Editions scientifiques. Paris, 1896.
13. BRANCAZ. — Contribution à l'étude du titrage de la pepsine pharmaceutique. *Th. Doct. Ph.*, Lyon, 1906.
14. BRIDEL. — Réflexions sur les diastases et leur spécificité. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1926, 8, p. 174.
15. COHNHEIM. — Chemie der Eiweisskörper. Brunswig, 1911.
16. CZAPECK. — Biochemie der Pflanzen. Iena, 1915.

17. DISDIER. — Contribution à l'étude de la digestion pepsique. *Th. Doct. Ph.*, Paris, 1904.
18. DUCLOY. — Contribution à l'étude des Peptones commerciales. *Th. Doct. Ph.*, Lille, 1936.
19. EFFRONT. — Les Enzymes et leurs applications. *Paris*, Gauthier-Villars, 1899.
20. ENSELME. — Contribution chimique à l'étude de la molécule protidique. *Th. Doct. Sc.*, Lyon, 1930.
21. EULER. — Enzyme und Co-enzyme. Stuttgart, 1926.
22. FALK. — The Chemistry of Enzyme Action. New-York, 1921.
23. FORBES. — The purification of pepsin, its properties and physical characters. *Journ. of biol. Chem.*, 1927, 71, 559 à 584.
24. FULD et LEVISON. — Die Pepsinbestimmung mittels der Edestinprobe. *Bioch. Ztschr.*, 1907, 6, 473.
25. FROMAGEOT. — L'industrie des fermentations. Paris, Bailière, 1930.
26. GUÉRIN. — Contribution à l'étude du dosage colorimétrique de la tyrosine et du tryptophane dans les matières protéiques. *Th. Ph. sup.*, Paris, 1932.
27. HAGER. — Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. Berlin, Julius Springer, 1930.
28. HARLAY. — De l'application de la tyrosinase à l'étude des ferments protéolytiques. *Th. Doct. Ph.*, Paris, 1900.
29. JAVILLIER. — Des ferments protéolytiques. *Th. Agrég. Ph.*, Paris, 1909.
30. JEANNERAT. — Recherches sur la caséine et la paracaseïne. *Th. Doct. Sc.*, Genève, 1937.
31. LEBEAU et COURTOIS. — Traité de Pharmacie chimique. Paris, Masson, 1938.
32. LEGRAND. — Contribution à l'étude des essais pharmaceutiques de la pepsine. *Th. Doct. Ph.*, Paris, 1929.
33. LOEB. — Les protéines. (Trad. MOUTON). Paris, 1924.
34. MACQUAIRE. — De l'emploi de la fibrine desséchée et pulvérisée dans l'essai de la pepsine. Paris, 1900.
35. MASCRÉ et BOUCHARA. — Influence du formol sur la précipitation des matières albuminoïdiques du lait. *Bul. Soc. Chim. biol.*, 1930, tome XII, p. 994-1000.

36. MASCRÉ et HERBAIN. — Influence du formol sur la précipitation des albumines sériques. *Bul. Soc. Chim. biol.*, 1930, XII, p. 978-994.
37. NADEAU. — Dosage des acides-monoaminés produits par l'hydrolyse de la gélatine. *Th. Doct. Sc.*, Genève, 1931.
38. OPPENHEIMER. — Die Fermente und ihre Wirkungen. Leipzig, Vogel, 1900.
— Lehrbuch der Enzyme. Leipzig, Thieme, 1927.
39. OSBORNE. — The vegetables proteins. London. Longmans, Green and C°, 1919.
— Biochemisches Handlexicon. Berlin, 1911-1931.
40. PASCAL. — Contribution à l'étude du *Cannabis sativa*. *Th. Doct. Ph.*, Toulouse, 1934.
41. PETIT. — Recherches sur la pepsine. Paris, Masson, 1881.
42. PIETTRE. — Biochimie des protéines. Paris, Baillière, 1937.
43. PIETTRE et VILA. — Application de la méthode à l'acétone à la séparation et à l'étude des matières protéiques dans l'albuminurie. *Journ. de pharm. et chim.*, 1926, 3, p. 97.
44. PLÉ. — Contribution à l'étude de la purification de la pepsine. *Th. Doct. Ph.*, Paris, 1929.
45. RENAUD. — Etude pharmacologique de la pepsine. *Th. Doct. Ph.*, Montpellier, 1923.
46. RINKE. — Zur Kenntnis proteolytischer Fermente. *Th. Doct. Philos.*, Leipzig, 1934.
47. SCHNEIDER. — Recherches sur la caséine. *Th. Doct. Sc.*, Genève, 1932.
48. SÖRENSEN. — Technique MESTREZAT. In : Fiches techniques de Chimie Biologique de FLEURY, Paris.
49. THOMAS. — Manuel de Biochimie. Paris, Masson, 1936.
50. TCHITCHIBABINE. — Traité de Chimie organique, 1925.
51. TSCHIRCH (A.). — Handbuch der Pharmakognosie. Leipzig, 1909.
52. WALDCHMIDT-LEITZ. — in Meyer-Jacobson's Lehrbuch d. organ. Chemie. Berlin, 1929.
53. WATTIEZ et STERNON. — Traité de Chimie végétale.
54. WEHMER. — Die Pflanzenstoffe. Iéna, Gustav Fischer, 1929-1934.

TABLE DES MATIERES

<i>Introduction</i>	9
---------------------------	---

1^{re} PARTIE : LA PEPSINE.

<i>Chapitre I.</i> — La pepsine; son activité protéolytique; son essai	13
<i>Chapitre II.</i> — Méthodes de dosage de la pepsine dans les diverses pharmacopées	27
<i>Chapitre III.</i> — Critique de ces méthodes	45

2^e PARTIE : L'ÉDESTINE.

<i>Chapitre IV.</i> — Origine; Caractères; Extraction; Pro- priétés générales	65
<i>Chapitre V.</i> — Hydrolyse de l'édestine par la pepsine.	87
<i>Chapitre VI.</i> — Vitesse de clivage de l'édestine	99

3^e PARTIE : APPLICATIONS.

<i>Chapitre VII.</i> — Titrage de la pepsine au moyen de l'édestine	111
CONCLUSIONS	125
BIBLIOGRAPHIE	127

